

NINA MORENA RÊGO MUNIZ DA SILVA

**DIVERSIDADE MICROBIANA E MICROBIOTA SOLUBILIZADORA DE
FOSFATO EM SOLOS DE CAFEZAIS ORGÂNICOS EM SISTEMAS
AGROFLORESTAIS E A PLENO SOL.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586d
2017
Silva, Nina Morena Rêgo Muniz da, 1989-
Diversidade microbiana e microbiota solubilizadora de
fosfato em solos de cafezais orgânicos em sistemas agroflorestais
e a pleno Sol / Nina Morena Rêgo Muniz da Silva. – Viçosa,
MG, 2017.
xi, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Raphael Bragança Alves Fernandes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Micro-organismos do solo. 2. Fosfatos.
3. Agrossilvicultura. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Solos. Programa de Pós-graduação em
Agroecologia. II. Título.

CDD 22 ed. 631.46

NINA MORENA RÊGO MUNIZ DA SILVA

DIVERSIDADE MICROBIANA E MICROBIOTA SOLUBILIZADORA DE FOSFATO EM SOLOS DE CAFEZAIS ORGÂNICOS EM SISTEMAS AGROFLORESTAIS E A PLENO SOL.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Anderson Almeida Pacheco

Davi Lopes do Carmo

Maurício Dutra Costa
(Coorientador)

Irene Maria Cardoso
(Coorientadora)

Raphael Bragança Alves Fernandes
(Orientador)

A minha irmã, Dandara.

DEDICO

“Não há uma pegada do meu caminho que não passe pelo caminho do outro.”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Lúcia, que sempre esteve comigo garantindo a melhor educação, sendo minha amiga e porto seguro. Ao meu pai Tavinho pelo carinho e amparo. Aos meus irmãos, Raphael e Caíque, pelo amor. A minha irmã Dandara, a quem eu dedico esse trabalho, que viveu comigo essa fase, me auxiliando, contribuindo para a realização desse projeto e me mostrando que os sonhos não envelhecem. A minha Tia Mana, por todo amor e incentivo aos estudos. As minhas amigas, Audrey, Camila, Marina, Jon Jon e Clara, pela amizade verdadeira. A Dra. Edwiges, que mesmo longe cuidou da minha saúde e bem estar.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade de estudo. À FAPEMIG, pela concessão da bolsa e auxílio financeiro. A secretária Rosângela, que cuida tão bem de todos os alunos e alunas, não nos deixando esquecer datas e compromissos. A professora Silvia Priore (comissão do PPG em Agroecologia), pelo acompanhamento durante a disciplina de seminário e o cuidado com cada discente, tornando-se um grande apoio. Aos funcionários e funcionárias da UFV, pela contribuição durante esse período, Carlos, Chico (*in memoriam*), Geovani, Cláudio, Adriana, Janilson (DPS); Seu Paulo (técnico), ao Paulo (porteiro), Emília e Danilo (Bioagro). Sem a ajuda de todos não seria possível à realização dessa pesquisa.

Ao meu orientador Raphael Bragança, pela excelente orientação e apoio. Especialmente, agradeço ao professor coorientador Maurício Dutra Costa por me receber tão bem no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) ao longo da realização dos experimentos, me auxiliando em todas as etapas e me fazendo sentir parte da equipe. Também, ao coorientador Gilberto de Oliveira Mendes, frutos deste trabalho também foram alcançados pelos ensinamentos adquiridos através dele. E à coorientadora, Irene Maria Cardoso, pelos ensinamentos agroecológicos, sendo essencial na ideia da pesquisa.

Ao professor Marcos Rogério Tótola e ao estudante de doutorado Gustavo Sampaio, por me auxiliarem nas análises de fosfatases, acompanhando todos os passos. À professora Maria Catarina, às técnicas de laboratório Camila e Jaqueline, pelo empréstimo de materiais e equipamentos, a Marliane e Isabelle pelos

conselhos moleculares. Ao Tomás, agradeço de todo coração, pela amizade e pelos conselhos estatísticos. A Fernanda Schulthais que auxiliou quando mais precisei. À Rafa Ventorim, por me ajudar com o uso de alguns equipamentos.

Agradeço aos amigos do LEM, pela ótima convivência e amizade. Em especial, ao Sérgio, que esteve comigo em cada etapa laboratorial como um grande amigo e conselheiro, tornando os dias mais leves. A Marcela, nossa agregada oficial. A Larissa, por me ajudar a contornar os erros com tanta paciência e carinho, ao Amarilson, pelas fotos e amizade.

Ao agricultor Edmar Lopes, sua esposa Elizangela e filhos, que cederem o espaço para a realização da pesquisa e por sempre me receberem tão bem. Da mesma forma agradeço aos agricultores Rosa, Samuel Lopes e filhos. Sou imensamente agradecida por esse apoio e pelos conhecimentos adquiridos.

Aos meus amigos, Ariel, Júnior Teixeira e Victor Hugo, pela coleta do material. MUITÍSSIMO obrigada pela ajuda e pela amizade mais que especial. Ao José Olívio, que me apresentou as propriedades me passando tranquilidade e confiança.

Ao projeto maravilhoso, Café com Agroecologia, que me possibilitou tanto conhecimento e orgulho de ter contribuído para o seu crescimento. E aos amigos que também foram essenciais para essa construção: Adalgisa e Paulo.

Aos amigos e amigas do PPG em Agroecologia, em especial: Nágilla, Sílvia Lopes, Clarice, Débora, Paula, Elizangela, Djalma, Eduardo, Aline, Lidiane, Renata, José Olívio, Júnia e Felipe.

Aos muitos amigos e amigas que cultivei durante esses anos em Viçosa e que me deram tanto amor e segurança de seguir em frente, agradecimentos mais que especiais: aos meus amigos da Agronomia Igor, Tomás, Hermano, Rodrigo e Juninho; aos amigos do Telegram; as minhas amigas da república, muito obrigada pelo ótimo convívio: Flávia, Maísa, Rose e Dan; ao Túlio pelo companheirismo e leveza.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem o convite e por toda contribuição para este trabalho.

A todos, que de alguma forma, me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho. MUITO OBRIGADA.

BIOGRAFIA

NINA MORENA RÊGO MUNIZ DA SILVA, filha de Otávio Muniz da Silva Filho e Lúcia de Fátima Rêgo, nasceu no dia 02 de outubro de 1989 em Belo Horizonte, Minas Gerais. Em março de 2009 iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), campus Viçosa/MG. Em agosto de 2015 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
Capítulo 1	18
Diversidade de micro-organismos do solo visando a microbiota solubilizadora de fosfato em cafezais agroecológico	18
RESUMO	18
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	46
AGRADECIMENTOS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO 2	53
Solubilização de fontes de fosfato por micro-organismos nativos de solos de cafezais agroecológicos.	53
RESUMO	53
ARTICLE 2	54
Potential of solubilization of different phosphate sources by microorganisms native to coffee soils subjected to agroecological management.....	54
ABSTRACT.....	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO	72
AGRADECIMENTOS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78

RESUMO

SILVA, Nina Morena Rêgo Muniz, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Diversidade microbiana e microbiota solubilizadora de fosfato em solos de cafezais orgânicos em sistemas agroflorestais e a pleno sol.** Orientador: Raphael Bragança Alves Fernandes. Coorientadores: Irene Maria Cardoso, Gilberto de Oliveira Mendes, Maurício Dutra Costa.

Em solos tropicais, os micro-organismos solubilizadores de fosfatos desempenham papel relevante, uma vez que a maior parte do P encontra-se indisponível para a absorção, limitando o crescimento das plantas. Nesse contexto, os sistemas agroflorestais, pelo favorecimento à maior quantidade e diversidade de micro-organismos no solo quando comparados com a monocultura apresentam potencial de proporcionar mais P disponível para as culturas agrícolas, reduzindo as perdas de P para as formas não lábeis. Assim, o trabalho teve como objetivos avaliar a dinâmica e diversidade de comunidades microbianas totais e solubilizadoras de fosfato em solos de cafezais agroecológicos orgânicos composto por SAF e monocultivo (Capítulo 1), e avaliar o potencial de solubilização de diferentes fontes de P por grupos de micro-organismos naturalmente presentes nesses manejos agroecológicos (Capítulo 2). Os tratamentos avaliados foram três diferentes manejos de cafezais agroecológicos da Mata-MG (*Coffea arabica* L., variedade Catuaí vermelho): cafezal em sistema SAF, com adubação de cama de frango (SAF_{CF}); cafezal a pleno sol, com adubação de cama de frango (PS_{CF}) e cafezal em sistema SAF com adubação natural (SAF_{NA}). Os solos foram analisados quanto à caracterização química, assim como quanto ao fracionamento sequencial de P, contagem da microbiota total cultivável e da microbiota solubilizadora de fosfato, e a análise da diversidade genética das populações de bactérias e fungos. Também realizou-se a avaliação do potencial de solubilização de diferentes fontes inorgânicas de P ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 e fosfato natural de Araxá), a atividade

enzimáticas das fosfatases ácidas e alcalinas. Maior concentração de bactérias em relação ao de fungos foi observada tanto na contagem dos micro-organismos totais, quanto da microbiota solubilizadora, porém os fungos tendem a apresentar maior eficiência na solubilização. A diversidade microbiana foi maior nos cafezais sob SAF. Micro-organismos solubilizadores de P foram identificados em todos os tratamentos e representaram 1,2; 0,9; 3,2% das bactérias totais para SAF_{CF}, PS_{CF} e SAF_{NA}, respectivamente. Para os fungos esse valor chegou a 30% em SAF_{NA} e em torno de 2,5% para SAF_{CF} e PS_{CF}. Conclui-se que os fungos solubilizadores de P demonstraram ser sensíveis ao tipo de manejo utilizado. O potencial de solubilização de fontes inorgânicas e natural de P pela microbiota nativa do solo não foi influenciado de forma significativa pelos diferentes manejos analisados. Porém as fontes de P utilizadas interferiram, seguindo a tendência decrescente das médias $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{AlPO}_4 > \text{FePO}_4 > \text{P-Araxá}$, confirmando que os mecanismos da solubilização de fosfato dependem tanto das espécies de fungos e bactérias quanto das diferentes fontes de fosfato. Nas análises das atividades enzimáticas em todos os tratamentos as atividades da fosfatase ácida foram maiores que a alcalina. Os cafezais sob SAFs apresentaram as maiores concentrações de P, sendo o SAF orgânico em torno de duas vezes mais que o SAF com adubação natural, o que pode estar associado à idade do sistema, onde sistemas mais velhos tendem a ter maiores concentrações de P-soma. A maior fração foi a de P-residual, que foi a única que diferiu estatisticamente entre os tratamentos, sendo maior nos cafezais sob SAFs. Os resultados encontrados aqui sugerem que a microbiota do solo possui capacidade na solubilização de fontes insolúveis de fosfato, utilizando diferentes mecanismos.

Palavras-chave: micro-organismos do solo, solubilização de fosfato, sistemas agroflorestais, fracionamento sequencial de P, diversidade microbiana.

ABSTRACT

SILVA, Nina Morena Rêgo Muniz, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Microbial diversity and phosphate solubilizing microbiota in organic coffee soils in agroforestry systems and complete sun.** Adviser: Raphael Bragança Alves Fernandes. Co-advisers: Irene Maria Cardoso, Gilberto de Oliveira Mendes, Mauricio Dutra Costa.

In tropical soils phosphate solubilizing microorganisms play a relevant role, since most of the P is unavailable for absorption, limiting plant growth. In this context, agroforestry systems (AFS) - by favoring the greater quantity and diversity of microorganisms in the soil when compared to monoculture, have the potential to provide more available P for agricultural crops, reducing losses of P to non-labile forms. The objective of this work was to evaluate the dynamics and diversity of total microbial communities and phosphate solubilizers in organic agroecological coffee soils composed of AFS and monoculture (Chapter 1) and to evaluate the potential of solubilization of different sources of P by micro groups -organisms naturally present in these agro-ecological management (Chapter 2). The evaluated treatments were three different managements of agro-ecological coffee plantations of Mata-MG (*Coffea arabica* L., Catuaí red variety): coffee in AFS, with chicken manure (SAF_{CF}); Coffee in full sun, with chicken manure (PS_{CF}) and coffee in AFS with natural fertilization (SAF_{NA}). Soils were analyzed for chemical characterization, as well as for the sequential fractionation of P, counts of the total cultivable microbiota and phosphate solubilizing microbiota, and analysis of the genetic diversity of bacterial and fungal populations. Of solubilization of different inorganic sources of P (Ca₃(PO₄)₂, AlPO₄, FePO₄ and natural phosphate of Araxá), the enzymatic activity of acid and alkaline phosphatases. Higher concentration of bacteria in relation to fungi was observed both in the counts of total microorganisms and in the solubilizing microbiota, but the fungi tend to present greater solubilization efficiency. The microbial diversity was higher in coffee plants under AFS. P-solubilizing microorganisms were identified in all treatments and represented 1.2; 0.9; 3.2% of the total bacteria for SAF_{CF}, PS_{CF} and SAF_{NA}, respectively. For fungi, this value reached 30% in SAF_{NA} and around 2.5% in SAF_{CF} and PS_{CF}. It was concluded that the solubilizing fungi of P showed to be sensitive to the type of management used.

The potential for solubilization of inorganic and natural sources of P by native soil microbiota was not significantly influenced by the different managements analyzed, but the sources of P used interfered, following the decreasing trend of the means $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{AlPO}_4 > \text{FePO}_4 > \text{P-Araxá}$, as showed in other works and confirming that the mechanisms of phosphate solubilization depend on fungal and bacterial species as well as on different phosphate sources. In the analyzes of the enzymatic activities in all the treatments the acid phosphatase concentrations were higher than the alkaline. Analyzing the sum (P-sum) of the fractions obtained by the sequential fractionation of P, the coffee plants under SAFs presented the highest concentrations of P, with organic SAF being around twice as much as the SAF with natural fertilization, which may be associated to the age of the system, where older systems tend to have higher P-sum concentrations. The largest fraction was P-residual, which was the only one that differed statistically among the treatments, being higher in the coffee plantations under SAFs. The results found here suggest that the soil microbiota has the capacity to solubilize insoluble phosphate sources, using different mechanisms.

Keywords: soil microorganisms, phosphate solubilization, agroforestry systems, sequential fractionation of P, microbial diversity.

INTRODUÇÃO GERAL

A denominada agricultura moderna, baseada em fundamentos convencionais herdados da Revolução Verde, apresenta como característica principal a intensificação do uso da terra objetivando aumento da produtividade agrícola (Koohafkan, Altieri, & Holt-Giménez, 2012). Essa agricultura tem como consequência perdas no equilíbrio e na sustentabilidade dos ecossistemas, com potenciais impactos negativos sociais, econômicos e ambientais, devido à especialização dos monocultivos, degradação e uso desmedido dos recursos naturais, crescente uso de insumos químicos, dependência de irrigação e mecanização (Holt-Giménez & Altieri, 2012) e perda da biodiversidade (Dirzo & Raven, 2003).

O cultivo de café no Brasil seguiu métodos tradicionais de produção, de forma semelhante ao verificado para a cana-de-açúcar e o algodão, sendo um dos responsáveis pela devastação da Mata Atlântica, que levou à intensa degradação dos solos (Dean, 1997). Localizada neste Bioma da Mata Atlântica, a Zona da Mata de Minas Gerais é exemplo desse cenário, onde cafezais e pastagens mudaram de forma impactante a paisagem florestada da região (Blasenheim, 1983). Essa região engloba 43% dos municípios produtores de café do estado, sendo responsável por 31% da produção mineira (Conab, 2017). Neles, o café é o principal produto comercial local, sendo prioritariamente cultivado como monocultura ou consorciado com milho ou feijão (IBGE, 2015). As áreas produtoras de café da região estão frequentemente associadas a altitudes mais elevadas e climas mais amenos, buscando-se microclima ideal para a produção de cafés de melhor qualidade (Silva, de Queiroz, Ferreira, Corrêa, & dos Santos Rufino, 2016).

Na Zona da Mata de Minas Gerais, em meados de 1970, surgiram as primeiras críticas a tal tipo de agricultura e que subsidiaram a formulação já, na década de 1990, da Agroecologia. Um dos princípios da agroecologia é o manejo de agroecossistemas diversos e capazes de sustentar seu próprio funcionamento (Costa et al. 2017). Nessa região, o desenvolvimento da agroecologia ocorreu com forte envolvimento de professores e estudantes da Universidade Federal de Viçosa (UFV), técnicos do Centro de Tecnologias Alternativas da Zona da Mata (CTA-ZM) e

a partir dos agricultores/as engajados nas Comunidades Eclesiais de Base (CEB) e organizados nos sindicatos dos trabalhadores rurais (Botelho, Cardoso, & Otsuki, 2016). Dentre as ações desenvolvidas por estes atores e instituições, encontravam-se experimentações com práticas alternativas de conservação do solo visando minimizar os impactos causados pela agricultura intensiva na região e propostas de uso da terra foram desenvolvidas, em especial no cultivo de café (Cardoso et al. 2001).

Dentre as experimentações estudadas destacam-se os sistemas agroflorestais (SAFs) diversos, com especial foco na recuperação de terras degradadas, desenvolvidos nas propriedades em parceria com os agricultores familiares (Cardoso et al., 2001). Esses sistemas desenvolvidos são considerados agroecológicos por serem sistemas multifuncionais que podem permitir mudanças favoráveis e simultâneas em vários componentes do agroecossistema, que desempenham importantes papéis na obtenção e manutenção de solos de alta qualidade, garantem maior aporte de matéria orgânica e favorecem a biodiversidade do solo (Saha, Ghosh, Mishra, Majumdar, & Tomar, 2010; Schroth et al., 2004; Soto, 2016).

Nos SAFs, a ciclagem de nutrientes é aumentada, em relação aos sistemas em monocultivo, a partir da incorporação de resíduos externos advindos das árvores e pelo *turnover* de raízes que contribuem para o aporte de matéria orgânica no solo, influencia a atividade microbiana e a qualidade do solo. Muitos destes SAFs são orgânicos. Neste caso o cultivo de café, além do consórcio com outras árvores, segue a legislação específica para a produção orgânica. Neste caso, quando realizada, a adubação é efetuada a partir de fontes orgânicas, sendo mais frequente o uso de esterco animal e resíduos vegetais. Uso de alguns fertilizantes minerais, quando ocorre, possuem restrição. No caso do P, permite-se o uso de fosfatos reativos, mais comumente conhecidos como fosfatos naturais (Jannoura, Georg, & Bruns, 2014; Sanchez, 1995).

Os SAFs influenciam a microbiota do solo de diversas maneiras. Uma das influências diretas e indiretas é a alteração do microclima do solo devido as espécies arbóreas (Silva et al., 2016) o que, juntamente com o aporte de resíduos

orgânicos, pode favorecer a diversidade funcional de micro-organismos (Assis Júnior, Zanuncio, Kasuya, Couto, & Melido, 2003; Balakrishna, Lakshmipathy, Bagyaraj, & Ashwin, 2016; Goberna, Navarro-Cano, & Verdú, 2016; Vallejo et al., 2012)

A diversidade funcional microbiana do solo é importante para a manutenção da qualidade dos solos, principalmente porque esses organismos atuam diretamente na dinâmica de nutrientes (Mader et al., 2002), dentre eles o fósforo (P). Diversos grupos de micro-organismos de solo presentes em condições naturais, atuam na dinâmica do fósforo, dentre eles os solubilizadores de fosfatos (Sharma, Sayyed, Trivedi, & Gobi, 2013). Esses desempenham importante papel no ciclo do P, estando associados à liberação desse nutriente tanto pela solubilização de formas inorgânicas quanto pela mineralização de formas orgânicas (Richardson & Simpson, 2011; Rodríguez & Fraga, 1999), por meio de vários mecanismos, dentre os quais destaca-se a produção de ácidos orgânicos (Mendes et al., 2014).

Os micro-organismos solubilizadores de P são principalmente, bactérias e fungos. As principais bactérias são *Pseudomonas* e *Bacillus*, além de *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (Rodríguez & Fraga, 1999). As micorrizas e os isolados fúngicos de *Aspergillus* e *Penicillium* estão entre os fungos solubilizadores mais estudados (Cardoso & Kuyper, 2006; Mendes et al., 2014; Souchie & Abboud, 2007).

Em solos tropicais os micro-organismos solubilizadores de fosfatos desempenham papel importante, uma vez que a maior parte do P encontra-se fixado, o que dificulta a absorção pelas plantas, limitando o crescimento das mesmas (Novais & Smith, 1999). Nesses solos, os sistemas agroflorestais - pelo favorecimento à maior quantidade e diversidade de micro-organismos, quando comparados à monocultura (Cardoso, Boddington, et al. 2003), podem aumentar a disponibilidade de P disponível para as culturas agrícolas, solubilizando o P fixado e reduzindo as perdas de P para as formas não lábeis (Cardoso, Janssen, Oenema, & Kuyper, 2003).

Entretanto, ainda é escassa a informação científica acerca da influência de sistemas agroecológicos, como os SAFs, sobre a atividade da biota de forma geral e

em especial sobre a comunidade microbiana solubilizadora de fosfato do solo. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos avaliar a dinâmica e diversidade de comunidades microbianas totais e solubilizadoras de fosfato em solos de cafezais agroecológicos orgânicos composto por SAF e monocultivo (Capítulo 1), e avaliar o potencial de solubilização de diferentes fontes de P por grupos de micro-organismos naturalmente presentes nesses manejos agroecológicos (Capítulo 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altieri, M. A. (2002). Agroecology: The science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(02\)00085-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00085-3)
- Assis Júnior, S. L., Zanuncio, J. C., Kasuya, M. C. M., Couto, L., & Melido, R. C. N. (2003). Atividade microbiana do solo em sistemas agroflorestais, monoculturas, mata natural e área desmatada. *Revista Árvore*, 27, 35–41.
- Balakrishna, A. N., Lakshmiathy, R., Bagyaraj, D. J., & Ashwin, R. (2016). Influence of alley cropping system on AM fungi, microbial biomass C and yield of finger millet, peanut and pigeon pea. *Agroforestry Systems*. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9949-4>
- Blasenheim, P. L. (1983). A regional History of the Zona da Mata Mineira 1870-1906.
- Botelho, M. I. V., Cardoso, I. M., & Otsuki, K. (2016). “I made a pact with God, with nature, and with myself”: exploring deep agroecology. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 40, 116–131. <https://doi.org/10.1080/21683565.2015.1115798>
- Cardoso, I. M., Boddington, C., Janssen, B. H., Oenema, O., & Kuyper, W. (2003). Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. *Agroforestry Systems*, 58(B1), 33–43.
- Cardoso, I. M., Guijt, I., Franco, F. S., Carvalho, A. F., & Ferreira Neto, P. S. (2001). Continual learning for agroforestry system design: University, NGO and farmer partnership in Minas Gerais, Brazil. *Agricultural Systems*, 69, 235–257. [https://doi.org/10.1016/S0308-521X\(01\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0308-521X(01)00028-2)
- Cardoso, I. M., Janssen, B. H., Oenema, O., & Kuyper, T. W. (2003). Phosphorus pools in Oxisols under shaded and unshaded coffee systems on farmers’ fields in Brazil. *Agroforestry Systems*, 58, 55–64. <https://doi.org/10.1023/A:1025436908000>

- Cardoso, I. M., & Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 116, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.03.011>
- Conab. (2017). Acompanhamento da safra brasileira_café2017. *Companhia Nacional de Abastecimento (BRASIL), 1 levantam.*
- Costa, M. B. da B., Souza, M., Júnior, V. M., Comin, J. J., & Lovato, P. E. (2017). Agroecology development in Brazil between 1970 and 2015. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 41, 276–295. <https://doi.org/10.1080/21683565.2017.1285382>
- Dean, W. (1997). *A ferro e fogo: a história da devastação da Mata Atlântica* (2nd ed.). Companhia das Letras.
- Dirzo, R., & Raven, P. H. (2003). Global State of Biodiversity and loss. *Annual Review of Environment and Resources*, 28, 137–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.28.050302.105532>
- Ferrari, E. A. (2010). Agricultura Familiar Camponesa, Agroecologia e estratégias de reprodução socioeconômica. *Dissertação_UFV*, 136.
- Goberna, M., Navarro-Cano, J. A., & Verdú, M. (2016). Opposing phylogenetic diversity gradients of plant and soil bacterial communities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1825), 20153003. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.3003>
- Holt-Giménez, E., & Altieri, M. A. (2012). Agroecology, Food Sovereignty and the New Green Revolution. *Journal of Sustainable Agriculture*, 37, 90–102. <https://doi.org/10.1080/10440046.2012.716388>
- IBGE. (2015). Produção agrícola municipal.
- Jannoura, R., Georg, R., & Bruns, C. (2014). Organic fertilizer effects on growth , crop yield , and soil microbial biomass indices in sole and intercropped peas and oats under organic farming conditions. *European Journal of Agronomy*, 52, 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.09.001>
- Júnior Marchiori, Milton e Melo, W. J. (2000). Alterações na matéria orgânica e na biomassa microbiana em solo de mata natural submetido a diferentes manejos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(6), 1177–1182.
- Koohafkan, P., Altieri, M. A., & Holt-Giménez, E. (2012). Green Agriculture : foundations for biodiverse , resilient and productive agricultural systems. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 10, 37–41.
- Mendes, G. D. O., Freitas, A. L. M. de, Pereira, O. L., Silva, I. R. da, Vassilev, N. B., & Costa, M. D. (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates

- when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64, 239–249. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0656-3>
- Richardson, A. E., & Simpson, R. J. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology*, 156, 989–996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319–339.
- Saha, R., Ghosh, P. K., Mishra, V. K., Majumdar, B., & Tomar, J. M. S. (2010). Can agroforestry be a resource conservation tool to maintain soil health in the fragile ecosystem of north-east India? *Outlook on Agriculture*, 39(B1), 191–196. <https://doi.org/10.5367/oa.2010.0004>
- Sanchez, P. A. (1995). Science in agroforestry. *Agroforestry Systems*, 30, 5–55.
- Schroth, G., Fonseca, G. a. B. Da, Harvey, C. a., Vasconcelos, H. L., Goscon, C., & Izar, A.-M. N. (2004). *Agroforestry and biodiversity conservation in Tropical Landscapes*. Island Press. <https://doi.org/10.1007/s10457-006-9011-z>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(A2), 1. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Silva, S. de A., de Queiroz, D. M., Ferreira, W. P. M., Corrêa, P. C., & dos Santos Rufino, J. L. (2016). Mapping the potential beverage quality of coffee produced in the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 3098–3108. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7485>
- Soto, R. L. (2016). Nematodes as soil quality indicators in coffee systems. *Dissertação_Wageningen UR*.
- Souchie, E. L., & Abboud, A. C. D. S. (2007). Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. *Semina: Ciências Agrárias*, 28(B4), 11–18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n1p11>
- Tótola, M. R., & Chaer, G. M. (2002). Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In *Tópicos em ciência do solo* (2nd ed., pp. 195–276). Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Vallejo, V. E., Arbeli, Z., Terán, W., Lorenz, N., Dick, R. P., & Roldan, F. (2012). Effect of land management and *Prosopis juliflora* (Sw.) DC trees on soil microbial community and enzymatic activities in intensive silvopastoral systems of Colombia. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 150, 139–148. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880912000370>

Capítulo 1

Diversidade de micro-organismos do solo visando a microbiota solubilizadora de fosfato em cafezais agroecológico

RESUMO

Grande parte do fósforo (P) do solo encontra-se indisponível para as plantas, limitando o seu crescimento. Partindo-se da hipótese de que a utilização de sistemas agroflorestais (SAF) pode favorecer a população de micro-organismos solubilizadores de fosfato, possibilitando maior disponibilidade de P para as plantas. Nesse sentido objetivou-se avaliar o efeito do manejo agroecológico de cafezais sobre a diversidade microbiana e a presença de micro-organismos solubilizadores de fosfato. Os tratamentos avaliados foram três diferentes manejos de cafezais agroecológicos da região da Zona da Mata-MG: cafezal em sistema SAF, com adubação de cama de frango (SAF_{CF}); cafezal a pleno sol, com adubação de cama de frango (PS_{CF}) e cafezal em sistema SAF com adubação natural (SAF_{NA}). Foi realizada a caracterização química, fracionamento sequencial de P, a contagem da microbiota total cultivável e da microbiota solubilizadora de fosfato, a análise da diversidade genética das populações de bactérias e fungos, nos solos de cada manejo. Os cafezais com adubação de cama de frango (SAF_{CF} e PS_{CF}) apresentaram os maiores valores de P (Mehlich-1), e não se verificou diferenças nas formas mais lábeis de P entre os tratamentos no fracionamento sequencial de P. Maior densidade populacional de bactérias em relação ao de fungos foi observada tanto na contagem dos micro-organismos totais, quanto da microbiota solubilizadora. A maior população bacteriana cultivável foi observada no solo do cafezal a pleno sol, com adubação de cama de frango (PS_{CF}) e a menor no cafezal em sistema SAF com adubação natural. A diversidade microbiana foi maior nos cafezais sob SAF. A disposição da diversidade microbiana no solo dos cafezais variou conforme a concentração dos atributos químicos e das frações de P no solo. Micro-organismos solubilizadores de P foram identificados em todos os tratamentos e representaram 1,2; 0,9; 3,2% das bactérias totais para SAF_{CF}, PS_{CF} e SAF_{NA}, respectivamente. Para os fungos esse valor chegou a 30% em SAF_{NA} e em torno de 2,5% para SAF_{CF} e PS_{CF}. Diante do exposto, conclui-se que os fungos solubilizadores de P demonstraram ser sensíveis ao tipo de manejo utilizado.

Palavras-chave: solubilização de fosfato; diversidade microbiana; manejo agroecológicos; sistemas agroflorestais; contagem de micro-organismos.

ABSTRACT

Much of the soil phosphorus (P) is available to plants, limiting their growth. Based on the hypothesis of the use of agroforestry systems (SAF), it may favor a population of phosphate solubilizing microorganisms, allowing greater availability of P to the plants. The objective of this study was to evaluate the effect of the agroecological management of coffee plantations on a microbial diversity and a presence of phosphate solubilizing microorganisms. The treatments attentive to three different management of agroecological coffee plantations in the region of Zona da Mata-MG: coffee in SAF system, with fertilization of chicken bed (SAF_{CF}); coffee in full sun, with fertilization of chicken bed (PS_{CF}) and coffee in SAF system with natural fertilization (SAF_{NA}). A chemical characterization, sequential fractionation of P, a total microbiota cultivable and phosphate solubilizing microbiota counts, an analysis of the genetic diversity of bacterial and fungal populations, our solos of each management. The coffee plants with chicken bed fertilization (SAF_{CF} and PS_{CF}) had the highest values of P (Mehlich-1), and are not verified in the most labile forms of P between treatments without sequential fractionation of P. Increased population density of bacteria in to the observation of both the total microorganism counts and the solubilizing microbiota. The largest cultivable bacterial population was observed without a full sun, with fertilization of chicken litter (PS_{CF}) and a lower one in the coffee tree in SAF system with natural fertilization. Microbial diversity was higher in coffee plantations under APS. An arrangement of the microbial diversity in the soil of the coffee plantations varied according to the concentration of the chemical attributes and the fractions of P in the soil. P-solubilizing microorganisms were identified in all treatments and represented 1.2; 0.9; 3.2% of the total bacteria for SAF_{CF}, PS_{CF} and SAF_{NA}, respectively. For fungi this value reached 30% in SAF_{NA} and around 2.5% for SAF_{CF} and PS_{CF}. In view of the above, it is concluded that the solubilizing fungi of P showed to be sensitive to the type of management used.

Keywords: phosphate solubilization; microbial diversity; agroecological management; agroforestry systems; micro-organism counts.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) está presente no solo tanto na forma orgânica como inorgânica, porém a maior parte encontra-se indisponível para a absorção pelas plantas, o que limita o crescimento das mesmas. Em solos tropicais, a disponibilidade de P para as plantas torna-se ainda mais baixa, devido sua retenção pelos óxidos de Al- e Fe (Novais & Smith, 1999). Diante desta redução de disponibilidade, comumente aplica-se fertilizantes sintéticos fosfatados, o que eleva os custos de produção e contribuem para o esgotamento das reservas fosfáticas mundiais, que são escassas (Cordell, 2009).

Alguns sistemas podem aumentar a eficiência da disponibilidade de nutrientes em solos tropicais, incluindo o P. Na região da Zona da Mata de Minas Gerais, a utilização de sistemas agroflorestais (SAFs) tem-se mostrado como um desses sistemas como uma possibilidade viável para diminuir os problemas causados pelo uso intensivo da terra e dos recursos naturais (Cardoso et al., 2001; Mendonça et al., 2001). Por recuperar nutrientes de horizontes mais profundos do solo e permite melhor proteção contra erosão (Franco et al., 2002). Possibilitando maior aporte da matéria orgânica do solo (Chander et al., 1998). Adicionalmente, proporciona melhores condições para a atividade de micro-organismos no solo, mostrando que o componente arbóreo influencia positivamente a comunidade microbiana (Zak et al., 2003; Schroth et al., 2004; McNeely & Scroth, 2006; Jose, 2009).

No solo, quanto mais diversa a comunidade microbiana maior a resiliência do ambiente, o que possibilita melhor capacidade de recuperação quando frente a condições adversas (Moreira & Siqueira, 2006). Isto ocorre, pois os micro-organismos atuam exercendo diversas funções essenciais para o funcionamento do ecossistema, como decomposição da matéria orgânica, degradação de substâncias tóxicas e disponibilização de nutrientes para as plantas, inclusive do fosfato (Mader et al., 2002), permitindo a redução da dependência de insumos manufaturados na agricultura (Vassilev et al., 2006).

A complexidade microbiana no solo permite a convivência de organismos com metabolismos distintos, mantendo interações em estado de equilíbrio

dinâmico, proporcionando assim, condições ideais para uma diversidade extremamente elevada. Entretanto, diferentes práticas agrícolas afetam o ambiente do solo, provocando distúrbios na comunidade microbiana que podem, influenciar os processos biogeoquímicos que nele ocorrem, afetando inclusive transformações de P no solo (Júnior & Melo, 2000; Wright, 2009). A busca por práticas de manejo mais sustentáveis e que permitam melhor desenvolvimento da microbiota, é fundamental para manter ou melhorar a qualidade do solo.

Dentre os micro-organismos do solo, uma pequena fração da microbiota total é formada por aqueles que são capazes de liberar P tanto pela solubilização de fosfato inorgânico, quanto pela mineralização de fosfato orgânico (Gyaneshwar et al., 2002). Em ambos os casos, o elemento passa a ser disponível para as plantas, com melhor rendimento e crescimento das culturas (Richardson & Simpson, 2011). Entre esses micro-organismos solubilizadores de fosfato, destacam-se bactérias e fungos do solo, esses últimos em geral apresentam maior capacidade de solubilização (Rodríguez & Fraga, 1999; Bucher, 2006; Mendes et al., 2013).

Quando se busca o isolamento de micro-organismos solubilizadores normalmente se coleta solo rizosférico, devido à interação planta-micro-organismos (Barea et al., 2005). Neste processo é usado o método de diluição serial em placa, utilizando meio de cultura sólido contendo precipitado de fosfato insolúvel. A detecção de um halo claro em torno das colônias é sinal de solubilização de fosfato (Mahadevamurthy et al., 2016). Ainda com suas limitações, dadas as inconsistência e variações na atividade dos micro-organismos solubilizadores de fosfato e o fato de apenas 1% ou menos dos organismos do solo serem cultiváveis, esse método ainda é largamente utilizado devido a sua facilidade e baixo custo de execução. O procedimento tem sido considerado útil em estudos comparativos sobre grupos de micro-organismos viáveis e cultiváveis em amostras de solo ou para estudo de micro-organismos específicos (Moreira & Siqueira, 2006).

Estudos mais refinados da comunidade microbiana total envolvem técnicas biológicas moleculares, que oferecem estimativas da estrutura, composição e diversidade das comunidades. Dentre essas técnicas, a extração do DNA do solo acompanhado de análises como o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

tem sido muito utilizada (Muyzer et al., 1993), uma vez que pode ser útil para diagnosticar a presença e abundância relativa de micro-organismos, como bactérias e fungos em amostras obtidas de solos (Nakatsu et al., 2000; Valasková & Baldrian, 2009).

O conhecimento da diversidade e dinâmica dos organismos do solo é essencial para o desenvolvimento de sistemas de manejos mais eficientes e mais voltados para a qualidade do solo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade microbiana, a presença de micro-organismos solubilizadores de fosfato e a dinâmica do P em solos sob manejo agroecológico de cafezais.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização das áreas

Os sistemas de produção avaliados neste estudo são de propriedades do município de Araponga, nos arredores do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, região da Zona da Mata, Minas Gerais, Brasil (Figura 1). A região apresenta altitude próxima de 1.300 m, temperatura média anual de 18°C e precipitação média anual de 1.500 mm, com períodos secos de dois a quatro meses (Golfari, 1975). Os solos predominantes na paisagem são os Latossolos Vermelho Amarelo (Embrapa, 2013). Os estabelecimentos agropecuários em geral são pouco mecanizados, com predomínio (> 90%) de cultivo do café arábicos, sendo uma pequena parcela (< 1%) associados com sistemas agroflorestais (IBGE, 2006). Outras culturas comuns na região são banana, laranja, cana-de-açúcar, mandioca, feijão e milho (IBGE, 2015).

O estudo foi conduzido em três diferentes áreas com o cultivo de cafezais agroecológicos orgânicos (*Coffea arabica* L., variedade Catuaí vermelho), sendo duas em sistema agroflorestal (SAF) e uma a pleno sol (PS). As áreas são próximas e de características semelhantes quanto à exposição à radiação solar. Essas três áreas compuseram os tratamentos avaliados no presente estudo: cafezal em SAF com adição de cama de frango (SAF_{CF}); cafezal a pleno sol com adição de cama de frango (PS_{CF}) e cafezal em SAF com adubação natural (SAF_{NA}), apenas com resíduos vegetal.

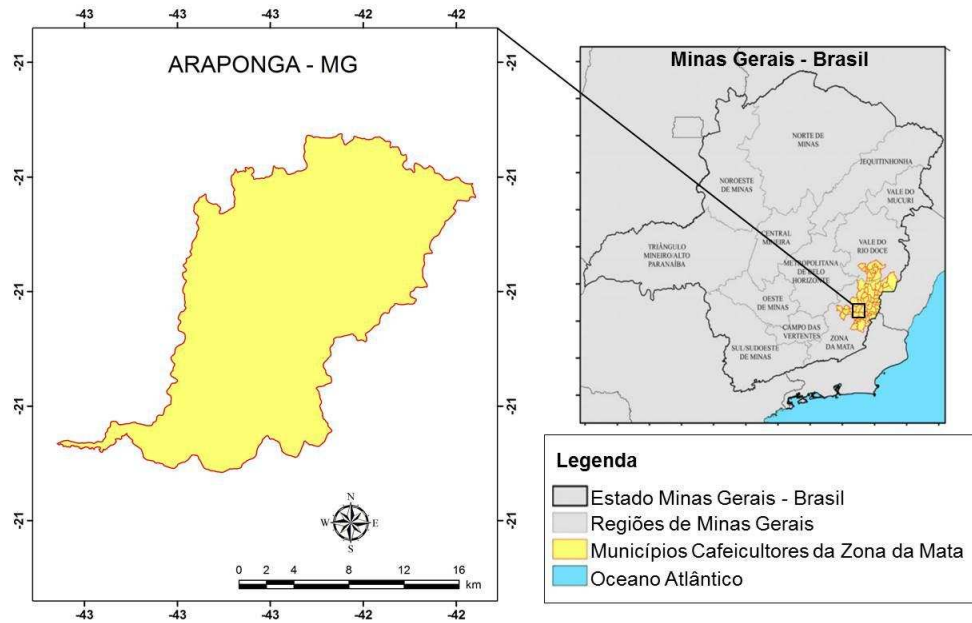


FIGURA 1. Localização do município de Araponga, onde o estudo foi realizado.

Fonte: IEDE-MG (2017) e Silva et al. (2015).

Uso e Manejo das áreas

Informações acerca das áreas de estudo e do seu manejo foram obtidas nos estudos de Soto (2016) e Vieira Júnior (2016), assim como é possível obter nessas referências informações sobre o histórico das áreas antes da implantação das práticas agroecológicas. As áreas de café são certificadas como orgânicas. Nos sistemas de manejo utilizam adubação verde e manejo adequado das plantas espontâneas, não utilizam agrotóxicos nem adubos minerais solúveis. A caracterização física dos solos de cada uma das áreas foi efetuada por Soto (2016), após amostragem entre agosto e setembro de 2015 (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização física do solo das áreas de estudo

Trat.	Argila	Silte	Areia	Classe Textural	DS kg dm ⁻³	Mi		Ma		PT
						m ³ m ⁻³		m ³ m ⁻³		
g Kg ⁻¹										
SAF _{CF}	45	12	43	Argilosa	1,16 b	0,29 a	0,21 a	0,21 a	0,51 a	
PS _{CF}	48	10	42	Argilosa	0,97 a	0,29 a	0,21 a	0,21 a	0,50 a	
SAF _{NA}	49	9	42	Argilosa	0,97 a	0,27 a	0,24 ab	0,24 ab	0,51 a	

DS: densidade do solo; Mi: microporosidade; Ma: macroporosidade; PT: porosidade total. Fonte: Soto (2016).

SAF_{CF} - Cafezal em SAF adubado com cama de frango

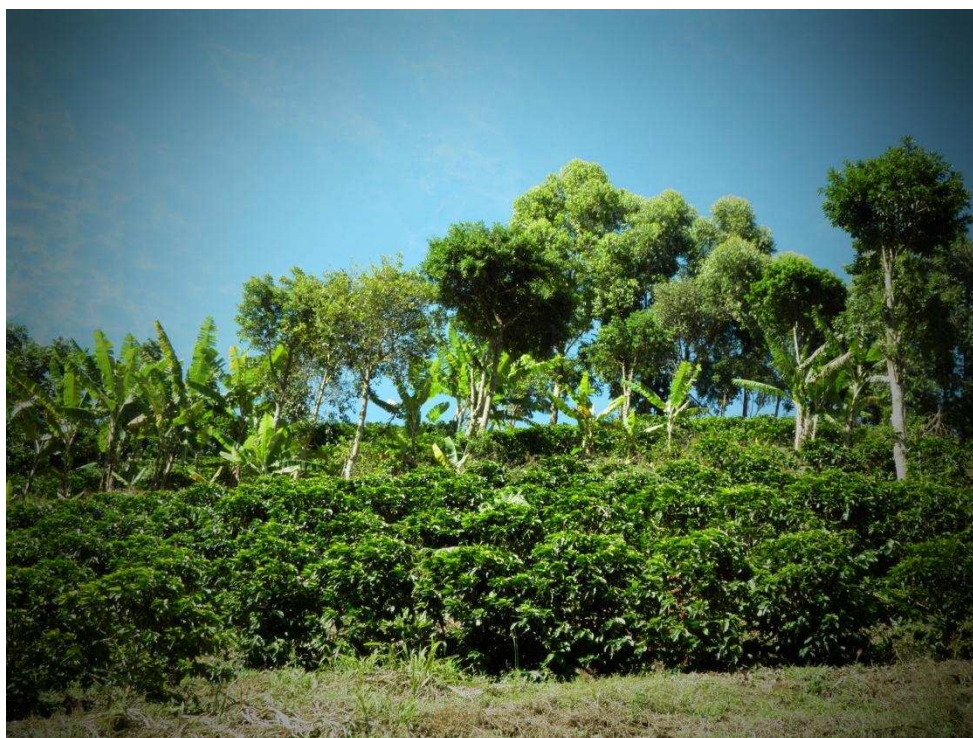


FIGURA 2. Sistema de cultivo em propriedade agroecológica com cafezal em SAF adubado com cama de frango

Este sistema é considerado agroecológico maduro, com implantação da lavoura de café em 2001 sob sistema convencional de produção. A transição agroecológica iniciou em 2003 (Figura 2. e hoje o cafezal é sombreado por árvores totalmente crescidas, diversificadas (nativas e exóticas) e distribuídas aleatoriamente. Os principais exemplares arbóreos são a peroba (*Aspidosperma*

polyneurum) e a capoeira branca (*Solanum argentum*), ambas em densidade aproximada de 40 árvores/ha. Bananeira (*Musa* sp.), em densidade de 160 árvores/ha que são utilizadas como quebra vento e estão localizadas nas bordas da lavoura. Algumas árvores de sombra ainda estão em desenvolvimento, devendo a área sombreada aumentar nos próximos anos.

A área possui aproximadamente 4,0 ha, com 1000 plantas de café/ha em espaçamento de 3,0 x 1,5 m. A cama de frango (4 kg/planta/ano) é aplicada na estação chuvosa, sob a copa do cafeeiro. Esporadicamente aplica-se fosfato natural e calcário a cada três anos. Quando necessário, para renovação ou raleamento, o café é podado e as folhas deixados na lavoura. A lavoura de café é certificada pela IBD Certificações.

PS_{CF} - Cafezal a pleno sol com cama de frango



FIGURA 3. Sistema de cultivo em propriedade agroecológica com cafezal a pleno sol adubado com cama de frango

Nesse sistema a lavoura de café é cultivada a pleno sol (Figura 3), ocupa área de 0,3 ha e, assim como no manejo SAF_{CF}, a adubação é basicamente pela adição de cama de frango e casca de café. Também há aplicação ocasional de fosfato natural reativo, uma vez por ano, comumente entre os meses agosto e setembro. A

densidade de plantas é próxima à maioria dos sistemas convencionais da região, com cerca de 4000 plantas/ha. A capina, geralmente é efetuada com roçadeira manual durante a estação chuvosa, porém quando a estação é prolongada, o agricultor utiliza enxada manual, esporádica, para o controle das plantas espontâneas. A poda das plantas de café é efetuada de forma semelhante ao manejo do sistema SAF_{CF}. A colheita é feita sem discriminação entre os frutos de café maduros e imaturos. A calagem é efetuada, aproximadamente, a cada três anos. Essa área, quando comparada com as demais, apresenta o maior declive.

SAF_{NA} - Cafezal em SAF com adubação natural

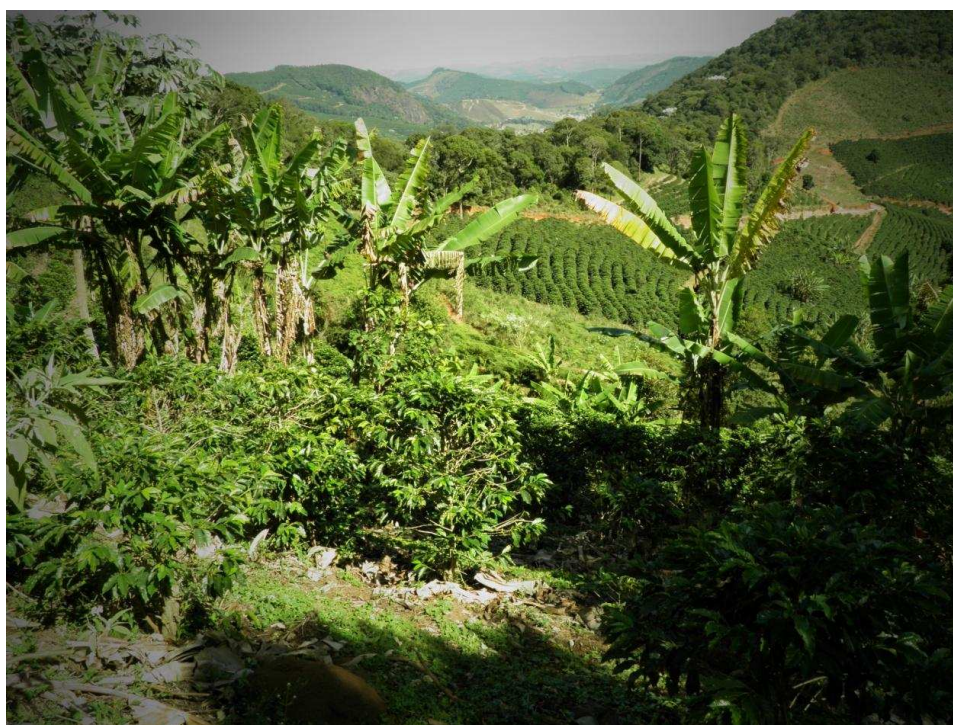


FIGURA 4. Sistema de cultivo em propriedade agroecológica com cafezal em SAF com adubação natural

Este sistema segue a prática japonesa da agricultura natural, baseado no princípio da purificação e pelo respeito à natureza. Nesta prática de agricultura evita-se o revolvimento do solo, não se utiliza agrotóxico, fertilizantes e adubação com resíduos animais. A adubação orgânica permitida é com resíduos vegetais produzidos na propriedade, a exemplo da adubação verde e serapilheira de mata

próxima (Fukuoka, 1995). Neste manejo busca-se o máximo aproveitamento dos processos naturais, privilegiando a força do solo.

Essa lavoura foi estabelecida nessas condições naturais em 2014, sendo a mais recente das áreas avaliadas (Figura 4). Possui 0,8 ha, com plantas de café em espaçamento 2,3 x 1,2 m. O café está consorciado aleatoriamente com, entre outras, espécies de bananeira (*Musa sp.*), capoeira branca (*Solanum argenteum*), palmeira real (*Archontophoenix cunninghamiana*) com densidade de 125, 40 e 20 árvores/ha, respectivamente. O amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) cobre toda a superfície do solo. A adubação é feita apenas com material vegetal oriundos de fragmentos de mata e da própria lavoura, como pseudocaule de bananeira, troncos de capoeira branca, amendoim forrageiro e serapilheira, além de casca de café, oriunda da própria lavoura. São feitas duas aplicações de materiais vegetais na projeção da copa do cafeeiro, uma no mês de novembro e outra após 45 dias. No total, são utilizados aproximadamente 20 kg de material vegetal por planta de café por ano. Essa lavoura é certificada como natural pela organização japonesa de Agricultura Natural Shumei.

Amostragem e caracterização química

Para a avaliação da qualidade dos solos, amostras foram coletadas para análises químicas, fracionamento de P e análises microbiológicas. Três amostras compostas de cada tipo de manejo foram coletadas na profundidade de 0 a 20 cm, em fevereiro de 2017. Cada amostra composta foi formada por oito amostras simples coletadas com trado sonda ao redor de quatro plantas de café selecionadas de forma aleatória. O material obtido foi dividido em duas porções, sendo uma delas disposta e mantida sob refrigeração a 4°C e destinada às análises microbiológicas. A outra porção foi utilizada nas análises químicas do solo, após obtenção da Terra Fina Seca ao Ar (TFSA). As análises foram realizadas no Laboratório de Física do Solo, do Departamento de Solos, e no Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), localizados na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Análise química

Na caracterização química determinou-se o pH em H₂O; a acidez potencial (H+Al); K e P extraídos por Mehlich-1; Ca, Mg e Al extraídos com KCl 1 mol/L. Com os resultados obtidos foram calculadas a capacidade de troca catiônica (CTC total e efetiva) e a saturação por bases (V%) e por alumínio (m%).

Fracionamento de P

O fracionamento químico de P foi efetuado conforme descrito por Zhang e Kovar (2009). Na Tabela 3 encontra-se uma síntese do fracionamento de P realizado (Tabela 2). Foram analisadas as frações de P-lábil (fracamente adsorvido) e P ligado a Al e Fe, P ocluso (aquele localizado no interior das partículas de argila) e P ligado a Ca, além do P residual, avaliado no resíduo submetido a todos os demais extratores. A última fração avaliada foi o P-residual, por meio de digestão triácida (EPA 3052) da amostra de solo que foi submetida a todos os extratores prévios. Todas as concentrações de P foram determinadas em equipamento ICP-OES. O P-total foi determinado pela soma de todas as frações obtidas pelo fracionamento sequencial.

Tabela 2. Detalhes do fracionamento químico de P utilizado no estudo

Fração	Solução	Concentração mol L ⁻¹	pH	Fração de P obtida
1	NH ₄ Cl	1	-	P-lábil (fracamente adsorvido)
2	NH ₄ F	0,5	8,2	Associado a Al
3	NaOH	0,1	-	Associado a Fe
4	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ + NaHCO ₃	0,3 + 1,0	8,5 (NaHCO ₃)	P-occluso
5	H ₂ SO ₄	0,25	-	Associado a Ca
6	HNO ₃ + HCl + HF	1	-	P-residual

NH₄Cl: cloreto de amônio; NH₄F: fluoreto de amônio; NaOH: hidróxido de sódio; Na₃C₆H₅O₇ + NaHCO₃: citrato de sódio e bicarbonato de sódio; H₂SO₄: ácido sulfúrico; HNO₃ + HCl + HF: ácido nítrico, ácido clorídrico e ácido fluorídrico.

Microbiota total cultivável e solubilizadora de fosfatos

Mistura de 1 g de solo de cada um dos manejos estudados em solução salina (NaCl 0,85%, m:v), em diferentes diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram plaqueadas, em triplicata, em meio de cultura NBRIP (Nautiyal, 1999), contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ como fonte de P e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalsky. Com o objetivo de selecionar fungos, algumas placas receberam 0,025 mL do antibiótico streptomina (20 mg L^{-1}), capaz de eliminar as bactérias. As placas foram então, incubadas em BOD por 12 dias a 37°C e 25°C , para o desenvolvimento de bactérias e fungos, respectivamente.

A avaliação da microbiota total cultivável foi efetuada pelo somatório da contagem do número de colônias nas placas. A avaliação da microbiota solubilizadora de fosfato foi obtida pela contagem das colônias que apresentaram halo transparente ao seu redor, correspondendo à zona de solubilização da fonte de fosfato utilizada. Ambos os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo seco (UFC g^{-1} solo).

Análise da diversidade genética das populações de bactérias e fungos

O DNA total foi extraído de 500 mg de solo previamente macerados das amostras de cada ponto de coleta, utilizando-se o kit comercial NucleoSpin®soil (Macherey-Nagel), conforme recomendações do fabricante.

A avaliação da qualidade e quantidade dos extratos de DNA foi conferida pela técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8 % e espectrofotometria UV (NanoDrop 2000). A reação em cadeia da polimerase (PCR) combinada com técnicas de *fingerprint* como eletroforese em gel de gradiente de desnaturalização (DGGE) foram conduzidas para investigar os padrões de bandas de genes de rDNA amplificados.

Análise da diversidade de bactérias

Os *primers* utilizados na primeira PCR para amplificar a região V1-V9 do rDNA 16S foram F27 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e R1492 (TACCTTGTTACGACTT)

(Deng et al., 2007). Na *nested* PCR buscou-se fragmentos menores de DNA, região V6-V9 do rDNA 16S. Nessa etapa a amplificação foi conduzida com os *primers* R1492 e U968 (AACGCGAAGAACCTTAC) (Favier et al., 2002) com grampo GC (Myers et al., 1985).

A mistura da primeira PCR foi preparada para volume final de 25 μ L, contendo 10 ng de DNA total; 0,1 μ M de cada *primer*; 5 μ L do tampão GoTaq Flex[®] Reaction Buffer; 10 mM de dNTP; 0,18 mg mL⁻¹ de albumina de soro bovino (BSA); 20 mM de MgCl₂; 1,25 U de GoTaq Flex DNA polimerase (Promega, Madison, EUA) e 13,475 μ L de água deionizada (Milli-Q) esterilizada. As amplificações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 1 min, 72 °C por 90 segundos para extensão dos *primers*, por último uma etapa de 72 °C por 7 min.

A *nested* PCR foi realizada utilizando 1 μ L da reação anterior como molde. A mistura foi composta por 0,04 μ M de cada *primer*; 5 μ L do tampão GoTaq Flex[®] Reaction Buffer; 5 mM de dNTP; 1,25 mg mL⁻¹ de BSA; 22,5 mM de MgCl₂; 2 U de GoTaq Flex DNA polimerase (Promega, Madison, EUA) e 12,75 μ L de água deionizada (Milli-Q) esterilizada em um volume de reação total de 25 μ L. As condições de análise foram: desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 61 °C por 1 min, 72 °C por 2 min para extensão dos *primers*, por último uma etapa de 72 °C por 10 min.

Análise da diversidade de fungos

A primeira PCR foi realizada para amplificar as regiões V1-V9 do rDNA 18S de fungos. Para isso foram usados os *primers* NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) (May et al., 2001) e EF3 (TCCTCTAAATGACCA) (Oros-Sichler et al., 2006). A mistura da PCR consistiu em 10 ng de DNA total; 0,03 μ M de cada *primer*; 5 μ L do tampão GoTaq Flex[®] Reaction Buffer; 5 mM de dNTP; 22,5 mM de MgCl₂; 2 U de GoTaq Flex DNA polimerase (Promega, Madison, EUA) e 15,45 μ L de água deionizada (Milli-Q) esterilizada em um volume de reação total de 25 μ L. As amplificações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial à 94 °C

taxonômica operacional (UTO), para executar os dendrogramas e alinhá-los de acordo com os marcadores externos, permitindo assim a normalização e comparações subsequentes entre amostras. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente binário de Dice de similaridade e no método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para a análise dos agrupamentos. Com o uso do PAST (Hammer et al., 2001) foram gerados os diagramas de Venn, as análises de riqueza (Chao - R) e a diversidade (Shannon - H) dentro de cada amostra calculados pela matriz de presença e ausência.

Análises estatísticas

Na análise dos dados obtidos foi considerado cada manejo avaliado como um tratamento, cujas médias dos diferentes atributos avaliados foram comparados, após ANOVA, por teste de média Tukey ($p < 0,05$). Quando necessário, foi efetuada a normalização dos dados por transformação logarítmica. Na avaliação dos resultados do fracionamento sequencial de P, a análise de variância foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e os tratamentos comparados pelo método de comparação múltipla de Dunn's, com diferenças significativas a 0,1%. O software estatístico utilizado em ambos os casos foi o Sigma Plot 12.5. As análises de componentes principais foram realizadas utilizando estatística multivariada de correspondência canônica utilizando-se o Software Canoco 4.5.

RESULTADOS

Caracterização química

As características químicas dos solos estudados segundo interpretação baseada nos critérios gerais do Comitê de Fertilidade do Solo de Minas Gerais, Brasil (CFSMG, 1999) indicam discretas diferenças dos tratamentos quanto à fertilidade do solo. Valores mais discrepantes são principalmente associados aos teores de P e K verificados no cafezal sob SAF com adubação natural (SAF_{NA}). Especificamente com relação ao P, a concentração da forma disponível (Mehlich-1) obtida em SAF_{NA} indica teor considerado muito baixo no solo (CFSMG, 1999).

A caracterização química dos solos em cada área avaliada é apresentada na Tabela 3. O menor pH foi observado no cafezal a pleno sol com cama de frango (PS_{CF}), em contraste com o maior valor verificado cafeeiro sob SAF (SAF_{CF}) que recebeu a mesma adubação. Os teores de Ca²⁺ acompanham os valores de pH. Os teores de matéria orgânica são considerados altos em todas as áreas, sendo coerentes com ambientes mais conservativos e agroecológicos.

Os maiores teores de P disponível foram verificados nos tratamentos SAF_{CF} e PS_{CF}, coerente com a aplicação da cama de frango, resíduo com maior teor de P (cerca de 3 %) quando comparado com outros estrumes orgânicos (Haggar et al., 2011). Ao mesmo resíduo foram associados os maiores teores de K disponível nos mesmos tratamentos. Embora os teores de Ca e Mg sejam consideráveis bons, a saturação de bases não ultrapassa os 50 %, muito em decorrência da elevada acidez potencial, provavelmente ligada aos altos teores de matéria orgânica.

Em todas as áreas estudadas o teor de alumínio (Al) foi zero, e consequentemente a percentagem de saturação por Al (m).

TABELA 3. Análise química de solo para todos os sistemas de estudo.

Trat.	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	MO	P-rem
	H ₂ O	mg/dm ³					cmol _c /dm ³				-- % --		dag/kg	μg/L
SAF _{CF}	5,6	31,4	326	3,8	1,6	0	7,3	6,2	6,2	13,5	46	0	8,0	20,1
PS _{CF}	5,2	47,3	517	3,3	1,8	0	7,4	6,5	6,5	13,9	47	0	7,2	26,7
SAF _{NA}	5,3	4,2	197	3,6	1,4	0	7,3	5,5	5,5	12,8	43	0	7,6	20,9

SB: Soma das bases; t: capacidade de troca catiônica efetiva, T: capacidade de troca catiônica a pH 7,0; V: percentagem de saturação de bases; m: percentagem de saturação por alumínio, MO: matéria orgânica; P-rem: fósforo remanescente.

Fracionamento de P

Praticamente não se verificaram diferenças entre as frações de P avaliadas nos três tratamentos estudados (Figura 5). Apenas os teores de P na fração residual diferiram entre tratamentos, com maiores valores associados aos cafezais sob SAF. Os teores totais de P também foram maiores nos cafezais manejados sob SAF,

sendo obtidos 863,36 e 486,78 mg P kg solo⁻¹ em SAF_{CF} e SAF_{NA}, quando comparado 381,11 no cafezal a pleno sol (PS_{CF}).

A análise dentro de cada tratamento indicou semelhante distribuição de formas de P nos solos, respeitando-se a sequência P-residual > P-Fe > P-Al > P-ocluso > P-lábil > P-Ca.

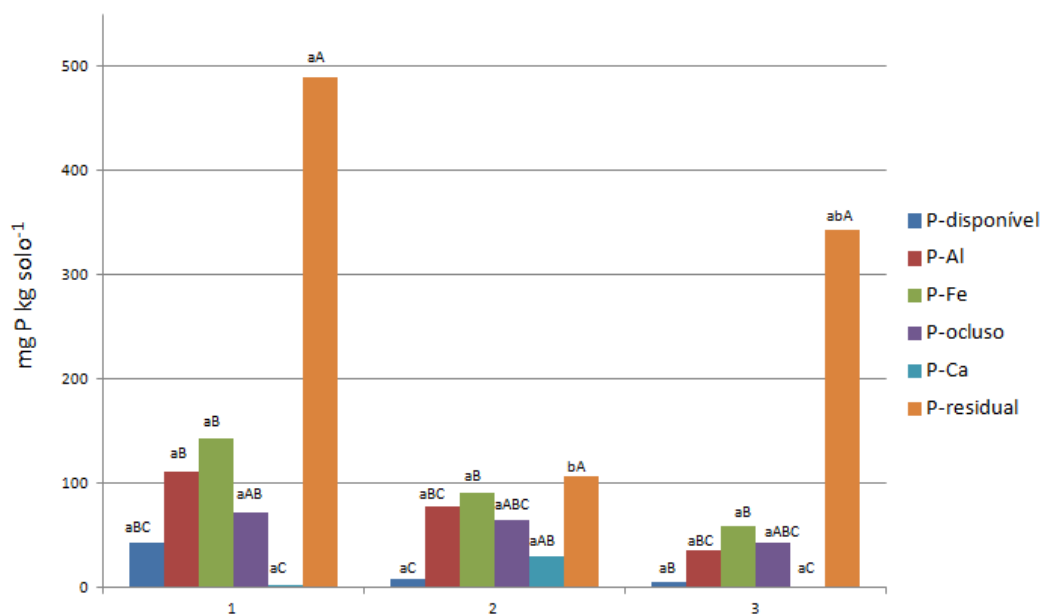


FIGURA 5. Fracionamento químico de P em diversas frações. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma fração de P e maiúscula não diferem dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Kruskal-Wallis. Tratamentos: 1 = cafezal sob SAF com cama de frango, 2 = cafezal a pleno sol, e 3 = cafezal sob SAF com adubação natural.

Microbiota total cultivável e solubilizadora de fosfatos

Na avaliação da microbiota solubilizadora de fosfatos, a contagem das colônias cultivadas em meio sólido NBRIP contendo fosfato de cálcio foi realizada até o 12^o dia após a inoculação, sendo considerados para a análise os resultados na diluição 10⁻² para bactérias e 10⁻¹ para fungos (Figura 6).

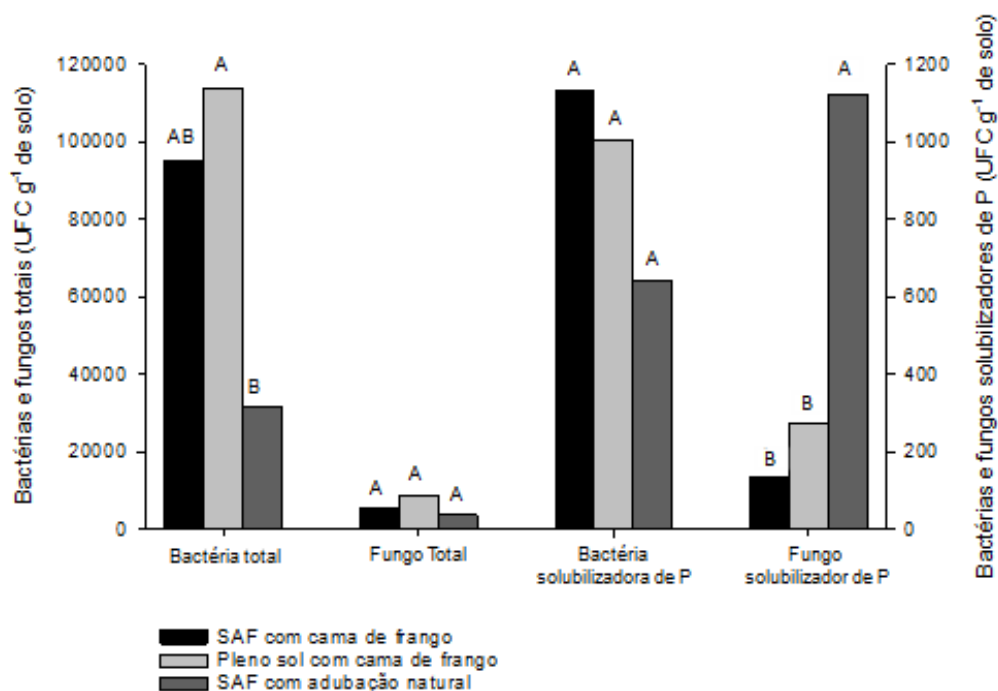


FIGURA 6. Bactérias e fungos (totais) e solubilizadores de fosfato (P) presentes em cafezais em SAF (sistemas agroflorestais) e a Pleno Sol. Mesma letra na coluna indica que não há diferença, dentro do mesmo grupo de micro-organismos, entre os tratamentos, Teste Tukey ($p < 0,05$).

O número médio de micro-organismos totais viáveis por grama de solo seco foi 10^4 a 10^5 UFC/g para bactérias e de 10^3 UFC/g para fungos, portanto houve maior presença de fungos do que de bactérias (Figura 4). Entre tratamentos, a população de fungos totais foi semelhante. A população de bactérias foi maior no cafezal a pleno solo, adubado com cama de frango (PS_{CF}) e a menor população foi associada ao cafezal sob SAF e adubação natural.

Micro-organismos solubilizadores de P foram identificados em todos os agroecossistemas avaliados (Figura 7). Não se verificaram diferenças na quantificação de bactérias solubilizadoras de P entre os tratamentos, e tais micro-organismos representaram 1,2; 0,9 e 2,0 % das bactérias totais estimadas, respectivamente, nos tratamentos SAF_{CF} , PS_{CF} , SAF_{NA} . Maior quantidade de fungos solubilizadores de P foi associada com o cafezal sob SAF e adubação natural, tratamento, no qual, tais micro-organismos representaram 30 % dos fungos totais.

Nos dois outros manejos (SAF_{CF} e PS_{CF}), verificou-se menor quantificação de fungos solubilizadores de P, que representaram 2,7 e 3,2 % dos fungos totais identificados nos respectivos tratamentos.

Na Figura 5 encontram-se exemplos de isolados de fungos provenientes dos tratamentos: SAF_{NA} , nas diluições 10^{-1} (1) e 10^{-2} (2); PS_{CF} , na diluição 10^{-1} (3); e SAF_{CF} , na diluição 10^{-1} (4). Os halos transparentes demonstram a presença de fungos.

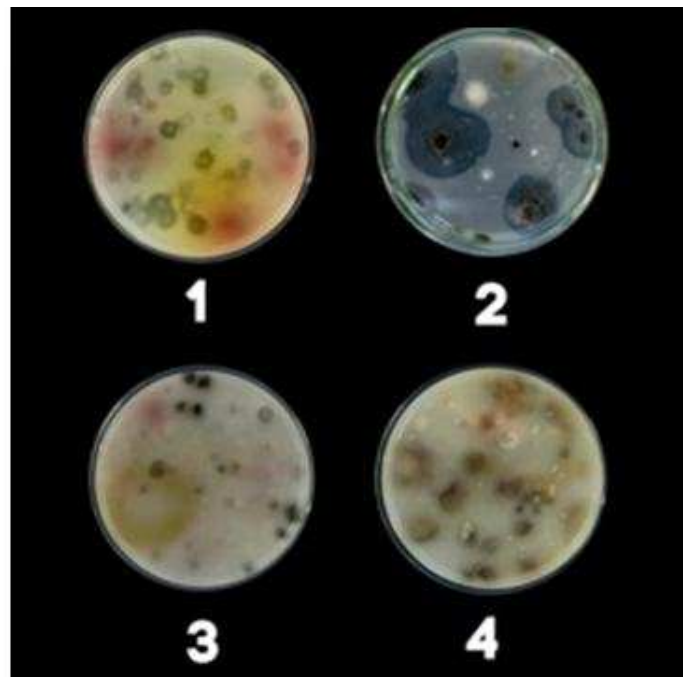


FIGURA 7. Placas com os fungos solubilizadores de P, caracterizados pelo halo transparente. Exemplo apresentado corresponde aos isolados de fungos provenientes dos tratamentos: SAF_{NA} , nas diluições 10^{-1} (1) e 10^{-2} (2); PS_{CF} , na diluição 10^{-1} (3); e SAF_{CF} , na diluição 10^{-1} (4).

Análise da diversidade genética das populações de bactérias e fungos do solo

A técnica de PCR-DGGE permitiu avaliar a comunidade de bactérias e fungos dos solos estudados e diagnosticou a presença de distintas unidades taxonômicas (UTOs) de bactérias e fungos. Isto se deu pela avaliação da presença ou ausência de bandas em todos os tratamentos analisados correspondendo aos dois grupos de micro-organismos (Figuras 8 e 9).

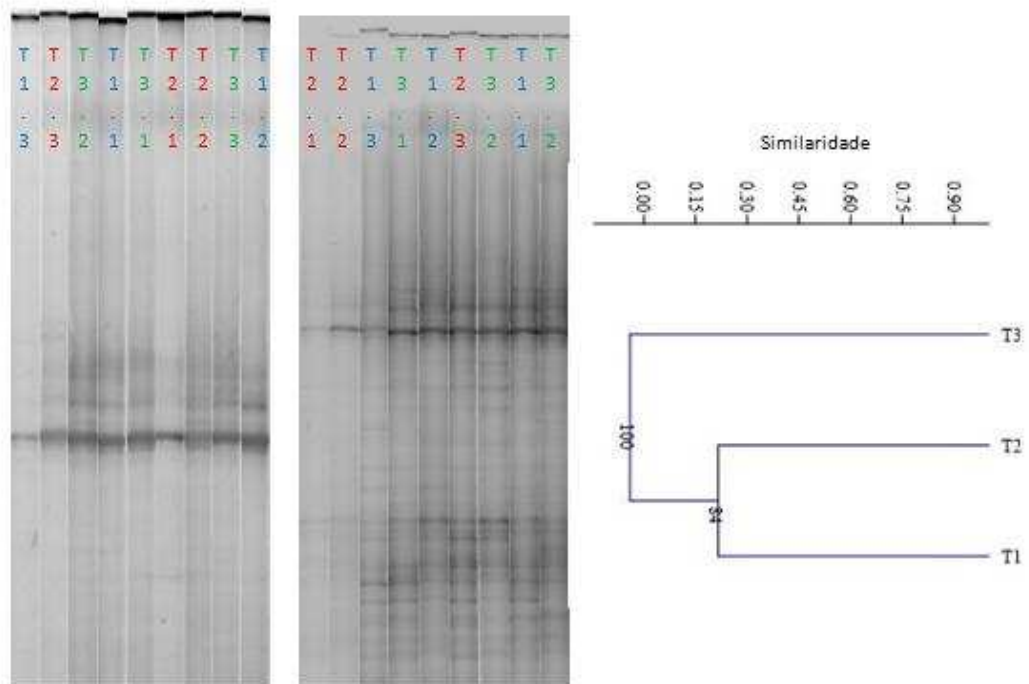


FIGURA 8. Dendrograma de similaridade e perfis eletrofóreticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias. O perfil à esquerda representa o primeiro gel com gradiente de 30 a 55 % e, o perfil à direita, o segundo gel com gradiente entre 45 a 60 %. T1, T2 e T3 representa SAF_{CF}, PS_{CF}, SAF_{NA}, respectivamente.

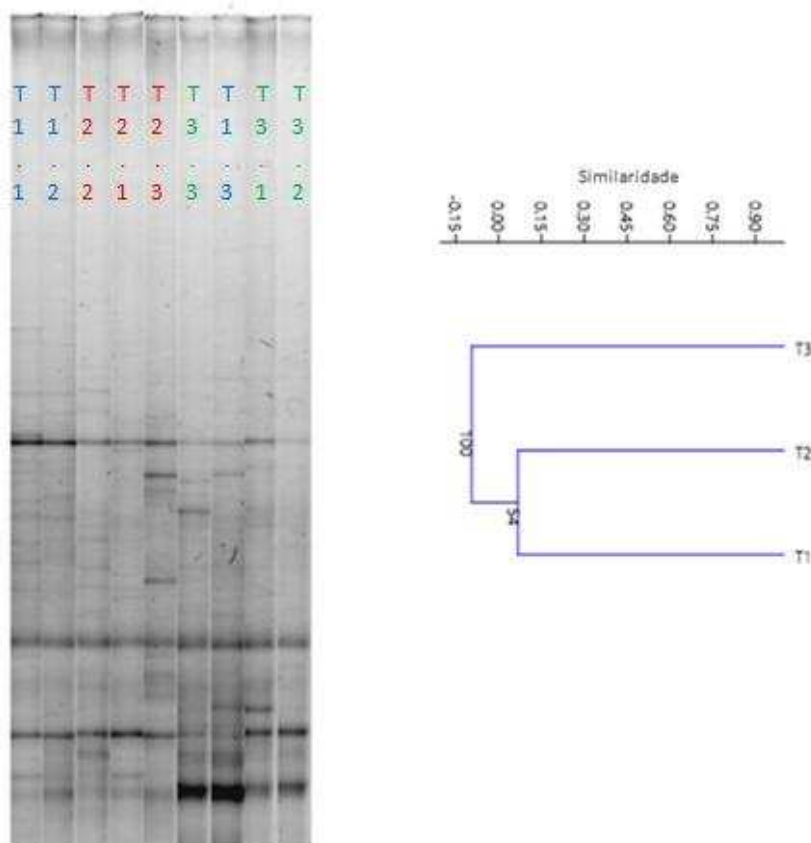


FIGURA 9. Dendrograma de similaridade e perfis eletrofóreticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 18S de fungos. T1, T2 e T3 representa SAF_{CF}, PS_{CF}, SAF_{NA}, respectivamente.

Os dendrogramas obtidos demonstraram a tendência de agrupamento das amostras provenientes dos cafezais que receberam cama de frango (SAF_{CF} e PS_{CF}), o que indica maior semelhança na comunidade microbiana desses tratamentos. Entretanto, a análise do diagrama de Venn (Figura 10), que apresenta as UTOs únicas e compartilhadas, indica que a análise da diversidade de fungos, que o solo do cafezal a pleno sol com cama de frango (PS_{CF}) compartilha os mesmos números de UTOs com os dois cafezais sob SAF, com (SAF_{CF}) ou sem (SAF_{NA}) recebimento de cama de frango. Na análise da diversidade de bactérias, o solo do cafezal sob SAF com cama de frango (SAF_{CF}) apresenta 8 UTOs compartilhadas com o do sob SAF e adubação natural (SAF_{NA}) e 7 UTOs com o cafezal a pleno sol com cama de frango (PS_{CF}), indicando maior similaridade de bactérias entre SAF_{CF} e SAF_{NA}. A avaliação efetuada indicou maior valor de UTOs únicas para o solo do cafezal sob SAF e

adubação natural (SAF_{NA}), enquanto o solo do cafezal a pleno sol com cama de frango (PS_{CF}) apresentou o menor valor. Nos três tratamentos avaliados foram identificados 11 UTOs de fungos e 25 UTOs de bactérias.

O índice de Chao-1 (R) é utilizado para a análise de riqueza através da estimativa do número total de UTOs em uma determinada comunidade. Por sua vez, a diversidade é estimada pelo índice de Shannon (H), que considera a abundância de espécies. Em todos os tratamentos avaliados, o número de bactérias foi superior ao de fungos, como indicado pelos maiores valores de R (Tabela 4). Embora menos expressivo em diferença, também a diversidade das bactérias foi superior à verificada para os fungos. Os dados apresentados nos diagramas de Venn corroboram com os índices avaliados (Tabela 4).

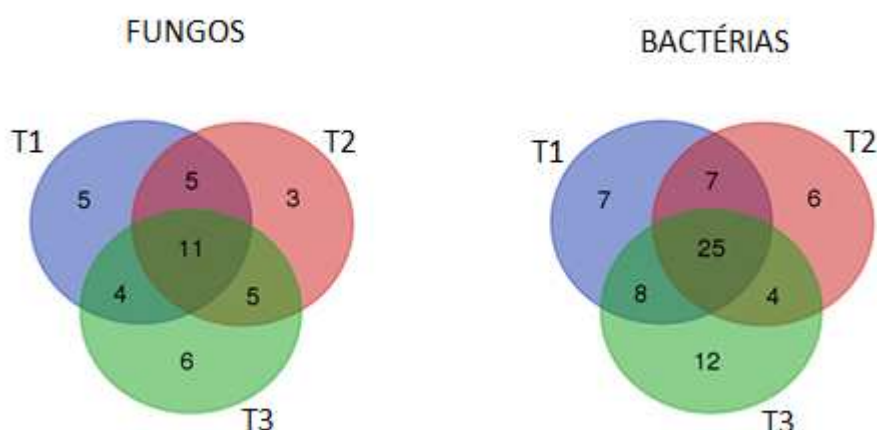


FIGURA 10. Diagrama de Venn das análises de diversidade de fungos e bactérias, indicando as UTOs únicas e compartilhadas entre as áreas dos três cafezais agroecológicos estudados. Onde T1, T2 e T3 representa SAF_{CF} , PS_{CF} , SAF_{NA} , respectivamente.

Duas análises de componentes principais (PCA) foram realizadas para cada grupo de micro-organismos (Figura 11 e 12). A primeira (PCA-1) utilizando os dados obtidos pelo DGGE, as análises químicas de rotina do solo (Tabela 4) e a microbiota total cultivável e solubilizadora de fosfatos e, uma segunda (PCA-2) substituindo-se os dados das análises químicas pelos do fracionamento sequencial de P. Os

resultados indicaram haver diferença nas comunidades de bactérias e fungos nos diferentes cafezais agroecológicos. Foi possível verificar que os atributos químicos e as contagens em placas interferem na distribuição de cada tratamento ao longo dos componentes principais.

TABELA 4. Índices de riqueza e de diversidade das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) de fungos e bactérias de cafezais agroecológicos

Tratamento	UTOs	Chao (R)	Shannon (H)
BACTÉRIA			
SAFCF	68	1128,0	3,85
PSCF	66	903,0	3,74
SAFNA	69	1225,0	3,89
FUNGO			
SAFCF	25	91,0	2,66
PSCF	24	86,7	2,54
SAFNA	26	145,0	2,78

Na PCA-1 para a diversidade de bactérias e fungos, com base nos perfis de PCR-DGGE (Figura 11), a análise das variáveis explicou 51,1 % da variabilidade dos dados, sendo que o primeiro componente respondeu por 31% e o segundo 20,1 % da variação. Nesse caso, as variáveis que mais contribuíram com a disposição da amostra do solo do cafezal a pleno solo com cama de frango (PSCF) foram os dados de P-rem e acidez potencial. Na disposição da amostra do solo do cafezal sob SAF e com cama de frango (SAFCF), as variáveis mais explicativas foram o pH, os teores de matéria orgânica e Ca. A amostra do solo do cafezal sob SAF e com adubação natural (SAFNA) não foi associada com nenhuma variável utilizada na PCA. Para a diversidade de fungo indicou que aqueles solubilizadores de fosfato afetam mais a disposição da amostra do solo do cafezal sob SAF e com adubação natural (SAFNA).

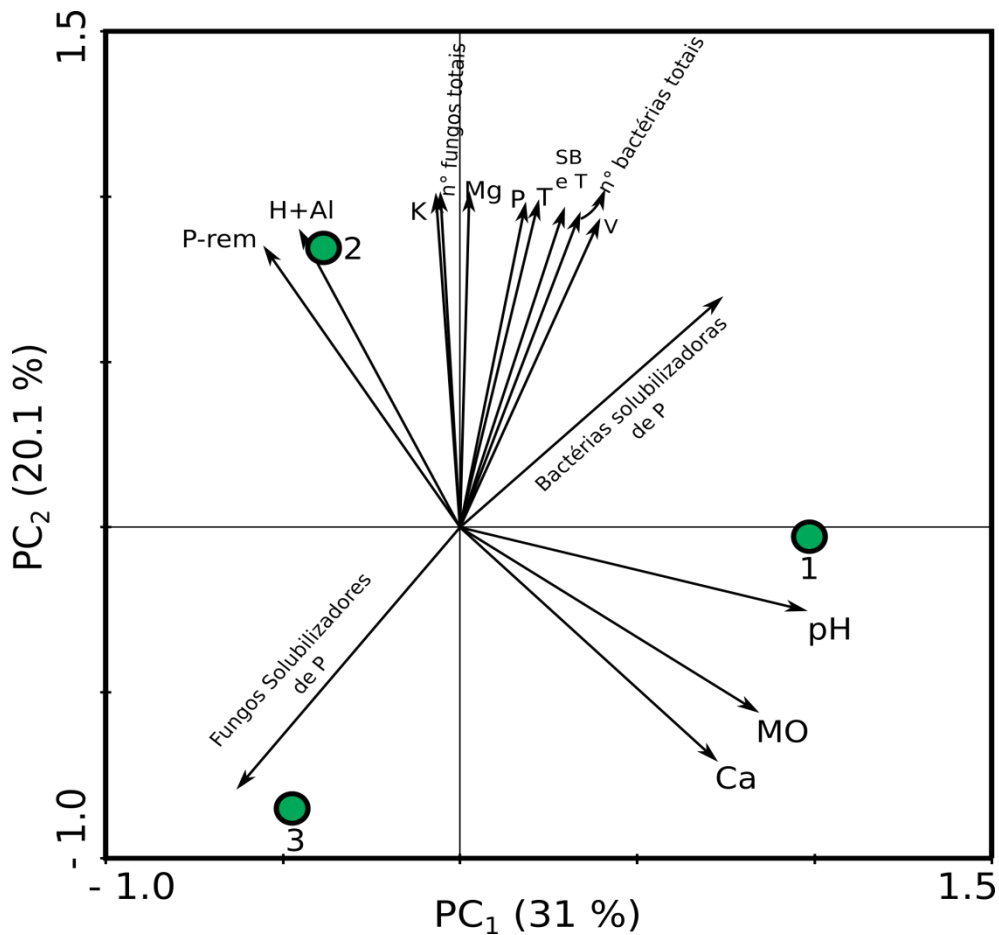


FIGURA 11. Análise de componentes principais (PCA-1) com base nos perfis de PCR-DGGE para a diversidade de bactérias e fungos e os atributos químicos dos solos dos cafezais avaliados (SAF_{CF} , PS_{CF} e SAF_{NA}). Onde 1, 2 e 3 representa a disposição da diversidade de bactérias e fungos de SAF_{CF} , PS_{CF} e SAF_{NA} , respectivamente.

Na PCA-2 analisaram-se os dados obtidos pelo fracionamento sequencial de P utilizando os perfis de PCR-DGGE para a diversidade de bactérias e fungos (Figura 12). Em ambos os grupos de micro-organismos estudados a disposição da diversidade microbiana analisada pelo método da PCR_DGGE indicaram a mesma tendência de influência. Todas as frações de P obtidas, exceto P ligado ao Ca, foram fatores determinantes na disposição da diversidade no cafezal sob SAF com cama de frango (SAF_{CF}). Os teores de P-Fe, P-Al e P-ocluído no solo explicam grande parte

da variação observada nos tratamentos SAF_{CF} e PS_{CF}. Na análise para bactérias e fungos, as variáveis explicaram a mesma porcentagem observada na PCA-1.

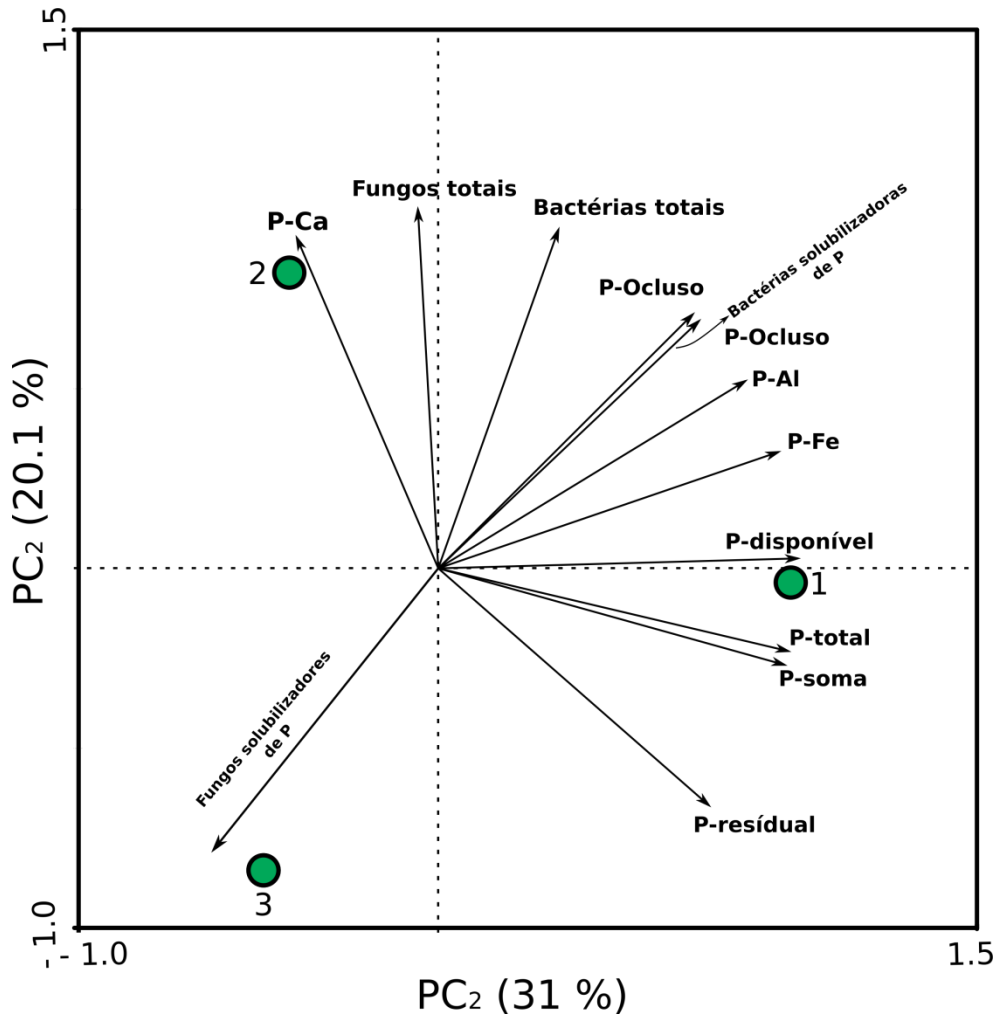


FIGURA 12. Análise de componentes principais (PCA-2) com base nos perfis de PCR-DGGE para a diversidade de bactérias e fungos e as frações de P, obtidas pelo fracionamento sequencial dos solos dos cafezais avaliados (SAF_{CF}, PS_{CF} e SAF_{NA}). Onde 1, 2 e 3 representa a disposição da diversidade de bactérias e fungos de SAF_{CF}, PS_{CF} e SAF_{NA}, respectivamente.

DISCUSSÃO

Os menores teores desses nutrientes são compatíveis com a ausência de adição de qualquer insumo químico ou de esterco de animais nesse tratamento.

Nos tratamentos SAF_{CF} e PS_{CF}, com a adubação orgânica com cama de frango e com a aplicação ocasional de fosfato natural, os teores apresentaram maiores. Também se observaram altos teores de matéria orgânica em todos os tratamentos e valores nulos de Al nos solos, o que pode ser explicado pelo fato de a matéria orgânica poder quelar o alumínio solúvel, contribuindo para a redução desse elemento que pode causar toxicidade às plantas (Hargrove e Thomas, 1981).

Os micro-organismos solubilizadores são comuns em solos, grupo formado principalmente por bactérias e fungos, que representam, respectivamente, de 1 a 50 % e de 0,5 a 1,0% da população total destes micro-organismos (Sylvester-Bradley, 1982; Kucey, 1983). Diferentes trabalhos têm demonstrado que embora em maior quantidade, as bactérias solubilizadoras de fosfatos são superadas pela maior eficiência dos fungos solubilizadores quanto à capacidade de solubilização (Souchie et al., 2007; Mendes et al., 2013). Os resultados obtidos no presente estudo também indicaram essa maior eficiência de fungos, tendo esse grupo apresentado maior proporção de organismos solubilizadores em função do total de fungos. De forma semelhante, Nahas et al. (1994) observaram que apesar de haver maior número de bactérias solubilizadoras de fosfato, apenas 16,5 % do total de bactérias foram capazes de solubilizar fosfato, enquanto 30,2% do total de fungos possuíam essa mesma capacidade. Uma das razões para essa maior eficiência dos fungos é o fato de serem mais tolerantes a condições ácidas, que são as favoráveis para a solubilização de fosfato (Mendes et al., 2014).

A dinâmica das bactérias solubilizadoras de fosfatos não foi influenciada pela adubação fosfatada e pela presença de espécies arbóreas no agroecossistema. Por sua vez, Barroti e Nahas (2000) verificaram incremento de bactérias solubilizadoras de fosfatos com o plantio de guandu adubado com fosfato natural.

A contagem de fungos solubilizadores de P apresentou maior proporção associado ao cafezal sob SAF com adubação natural, tratamento com menor teor de P-disponível (Mehlich-1). Essa relação tem sido relatada na literatura. Em estudo realizado na Etiópia, que buscou investigar os fatores ambientais que afetam a diversidade e a composição comunitária das micorrizas arbusculares em lavouras de café, Beenhouwer (2015) observou que a alta disponibilidade de P do solo reduz a

diversidade desses micro-organismos. A disponibilidade de P é indicada como um dos fatores mais importantes que determinam a diversidade de fungos nas raízes de café em solos tropicais, assim como de outras espécies, como milho, maçã e batata (Verbruggen et al., 2012; Van Geel et al., 2015).

No geral, espera-se que a dependência da planta hospedeira às associações micorrízicas aumente em ambientes pobres em P (Johnson et al., 2013). Essas associações são importantes para a dinâmica de P no solo, pois podem contribuir ainda mais com a absorção do nutriente, por atuarem na mineralização de P orgânico e na aquisição de P de camadas mais profundas, onde as raízes das plantas não conseguem alcançar (Bolan et al., 1991).

A adição de fosfato natural nos tratamentos com adubação orgânica (SAF_{CF} e PS_{CF}), também influenciam a dinâmica dos micro-organismos solubilizadores de fosfato. Os fosfatos de rocha, como as do fosfato de Araxá, Catalão e Patos de Minas, apresentam composição heterogênea, o possibilita a liberação de diversos compostos durante o processo de solubilização, como por exemplo, o fluoreto, componente das fluorapatitas que inibe o crescimento de microrganismos e a solubilização de P (Mendes et al., 2013). Mendes et al. (2015) observaram que a remoção do fluoreto com biocarvão provocou aumento significativo na solubilização de P pelo fungo *Aspergillus niger*. Tolerância a esse elemento tem sido conseguida com manipulação genética, como efetuado por Silva et al. (2015) ao procurar selecionar os mutantes de *A. niger* eficientes na solubilização P na presença de fluoreto.

A contagem de bactérias cultiváveis totais foi maior nos cafezais PS_{CF}, muito embora esse grupo tenha sido predominante em comparação aos fungos em todos os sistemas avaliados. De modo geral, as bactérias são efetivamente mais dominantes nos agroecossistemas (Moreira e Siqueira, 2006), o que foi observado no presente estudo, tanto se utilizando o método de diluição seriada como o método molecular.

Na análise da diversidade genética das populações de bactérias e fungos do solo, observou-se que os SAFs apresentaram maiores índices de riqueza (Chao-R) e diversidade (Shannon-H), assim como maior número de UTOs, indicando maior

diversidade nesses sistemas em relação ao sistema em monocultivo, mesmo sendo com manejo agroecológico. O número de UTOs únicas foram maiores nesses sistemas em relação ao cultivo a pleno sol. Como indicado por alguns autores, os SAFs apresentam papel importante na conservação da biodiversidade no solo, sendo essa uma das explicações de como esses sistemas auxiliam na preservação as espécies sensíveis, minimizando impactos importantes sobre o habitat natural dessas espécies (Jose, 2012).

As análises de componentes principais (PCA) (Figura 11 e 12), revelaram que características do solo podem afetar as comunidades microbianas do solo, como também verificado por Rousk et al. (2010) e Hazard et al. (2013). A diversidade microbiana dos cafezais variou em função de atributos químicos do solo (Figura 9) e das diferentes frações de P no solo (Figura 3 e 10).

Nos cafezais sob SAF o teor de P-total (soma de todas as frações de P) foi maior do que no cafezal a pleno sol com cama de frango, o que pode estar relacionado com a ciclagem promovida pelo componente arbóreo. O aporte mineral de P nos tratamentos com adubação orgânica influenciou nos teores de P-Fe, P-Al e P-Ocluso no solo, explicando assim a disposição da diversidade microbiana observada (Figura 12). Houve tendência de maior fração de P-lábil nos cafezais sob SAF, isso confirma o que foi concluído por Cardoso et al. (2003), que o SAF mantém maiores frações de P disponíveis para as culturas agrícolas, influenciando a dinâmica de P, podendo contribuir através da conversão de parte do P inorgânico em P orgânico, reduzindo assim as perdas de P para formas indisponíveis.

Estudos recentes envolvendo micro-organismos solubilizadores de fosfato tem sido voltados para refinamentos baseados em análises moleculares, com foco nos mecanismos genéticos utilizados por essa comunidade microbiana. Essa pode ser uma interessante fronteira a ser exploradas para continuar o aprofundamento da dinâmica das populações desses microrganismos que, em sistemas agroecológicos, tem encontrado ambientes mais adequados para a sua conservação e atuação em prol do melhor aproveitamento do P-nativo.

CONCLUSÕES

Solos cultivados com cafezais em manejo agroecológico sob SAFs favorecem a biodiversidade e riqueza de micro-organismos, potencializando a presença de microbiota solubilizadora de P.

Fungos solubilizadores de P demonstraram ser mais sensíveis ao tipo de adubação utilizada no manejo agroecológico, apresentando potencial de utilização como indicadores de alterações nas práticas adotadas.

A maior similaridade microbiana entre SAF_{CF} e PS_{CF} é provavelmente por causa da adubação com cama, pois homogeniza o tipo de material orgânico adicionado ao solo. A maior diversidade verificada no SAF_{NA} pode ser devido aos resíduos de mata aportado, possivelmente portador de maior diversidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barea JM, Pozo MJ, Azcon R, Azcon-Aguilar C (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417):1761-1778.
- Barroti G, Nahas E (2000) População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2043-2050.
- Beenhouwer M, Van Geel M, Ceulemans T, Muleta D, Lievens B, Honnay O (2015) Changing soil characteristics alter the arbuscular mycorrhizal fungi communities of Arabica coffee (*Coffea arabica*) in Ethiopia across a management intensity gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 91:133-139.
- Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and soil* 134(2):189-207.
- Bucher M (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173(1):11-26.

- Cardoso IM, Guijt I, Franco FS, Carvalho AF, Neto PF (2001) Continual learning for agroforestry system design: university, NGO and farmer partnership in Minas Gerais, Brazil. *Agricultural Systems* 69(3):235-257
- Cardoso IM, Janssen BH, Oenema O, Kuyper TW (2003) Phosphorus pools in Oxisols under shaded and unshaded coffee systems on farmers fields in Brazil. *Agroforestry systems* 58(1):55-64.
- CFSMG Comissão de fertilidade do solo do Estado de Minas Gerais (1999) Recomendação para o uso de fertilizantes e corretivos em Minas Gerais (5ª aproximação). Viçosa, MG: CFSEMG.
- Chander K, Goyal S, Nandal DP, Kapoor KK (1998) Soil organic matter, microbial biomass and enzyme activities in a tropical agroforestry system. *Biology and Fertility of Soils*. 27(2):168-172.
- Cordell D, Drangert JO, White S (2009) The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19(2):292-305.
- Deng W, Wanapat M, Ma S, Chen J, Xi D, He T, Mao H (2007) Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences manifest rumen bacterial diversity in Gayals (*Bos frontalis*) fed fresh bamboo leaves and twigs (Sinarumdinaria). *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 20(7):1057.
- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology* 68(1):219-226.
- Franco FS, Couto L, Carvalho AFD, Jucksch I, Fernandes Filho EI, Silva E, Meira Neto JAA (2002) Quantificação de erosão em sistemas agroflorestais e convencionais na Zona da Mata de Minas Gerais. *Revista Árvore* 26(6):751-760
- Fukuoka, M (1995) *Agricultura Natural: teoria e prática da filosofia verde*. São Paulo, SP. Editora Nobel 1-300.
- Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245:133-143.
- Haggar J, Ayala A, Díaz B, Reyes CU (2001) Participatory design of agroforestry systems: developing farmer participatory research methods in Mexico. *Development in Practice* 11(4):417-424.

- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2008) PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. Paleontological Museum, University of Oslo, Noruega. (Também disponível em linha: <http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>).
- Hargrove WL, Thomas GW (1981) Effect of organic matter on exchangeable aluminum and plant growth in acid soils. *Chemistry in the soil environment, chemistryinthes*: 151-166.
- Hazard C, Gosling P, Van Der Gast CJ, Mitchell DT, Doohan FM, Bending GD (2013) The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *The ISME Journal* 7(3):498.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2006) Censo Agropecuário. Disponível em <https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/mg/araponga/pesquisa>. Acesso: 30 de março de 2017
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015) Produção Agrícola Municipal. Disponível em <https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/mg/araponga/pesquisa>. Acesso: 30 de março de 2017
- IEDE-MG Infraestrutura Estadual de Dados Espaciais de Minas Gerais (2017). Disponível em: <http://www.iga.mg.gov.br/IEDE/Catalogo.html>. Acesso: 13 de junho de 2017.
- Johnson NC, Angelard C, Sanders IR, Kiers ET (2013) Predicting community and ecosystem outcomes of mycorrhizal responses to global change *Ecology Letters* 16:140-153
- Jose S (2009) Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: an overview. *Agroforestry Systems* 76(1):1-10.
- Jose S (2012) Agroforestry for conserving and enhancing biodiversity. *Agroforestry Systems* 85(1):1-8.
- Júnior MM, de Melo WJ (2000) Alterações na matéria orgânica e na biomassa microbiana em solo de mata natural submetido a diferentes manejos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35(6):1177-1182.
- Júnior Vieira JOL (2016) Comunidades de nematoides do solo em cafeeiros agroflorestais com diferentes sistemas de adubação orgânica. Viçosa. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Federal de Viçosa.

- Kucey RMN (1983) Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science* 63(4):671-678.
- Kundu BS, Nehra K, Yadav R, Tomar M (2009) Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. *Indian Journal of Microbiology* 49(2):120-127.
- Mäder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, Niggli U (2002) Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296(5573):1694-1697.
- Mahadevamurthy M, Sidappa M, Thriveni MC, Mythrashree SR, Amruthesh KN (2016) Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere soil and its effect on seed growth parameters of different crop plants. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 4(6):22-26.
- Massensini AM, Tótola MR, Borges AC, Costa MD (2015) Potential Phosphate Solubilization Mediated by Rhizospheric Microbiota of Eucalyptus Cultivated in a Typical Toposequence of the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 39(3):692-700.
- May LA, Smiley B, Schmidt MG (2001) Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* 47(9):829-841.
- McNeely JA, Schroth G (2006) Agroforestry and biodiversity conservation—traditional practices, present dynamics, and lessons for the future. *Biodiversity & Conservation* 15(2):549-554.
- Mendes GO, de Freitas ALM, Pereira OL, da Silva IR, Vassilev NB, Costa MD (2014) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64(1), 239-249.
- Mendes GO, Dias CS, Silva IR, Júnior JIR, Pereira OL, Costa MD (2013) Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(1):43-50.
- Mendes GO, Zafra DL, Vassilev NB, Silva IR, Ribeiro JI, Costa MD (2014) Biochar enhances *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* 80(10):3081-3085.
- Mendonça ES, Leite LFC, Ferreira Neto PS (2001) Coffee plantation in agroforestry systems: an option to remediate degraded soils. *Revista Árvore* 25:375-383.

- Moreira FMS, Siqueira JO (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2nd edition. UFLA, Lavras, 83-161.
- Muleta D, Assefa F, Börjesson E, Granhall U (2013) Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 12(1):73-84.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3):695-700.
- Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 13(9):3131-3145.
- Nahas E, Fornasieri DJ, Assis LC (1994) Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. *Scientia Agricola* 463-469.
- Nakatsu CH, Torsvik V, Øvreås L (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* 64(4):1382-1388.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170(1):265-270.
- Novais RF, Smith TJ (1999) *Fósforo em solo e planta sob condições tropicais*. Raleigh: Universidade Federal de Viçosa–North Carolina State University.
- Oros-Sichler M, Gomes NC, Neuber G, Smalla K (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods* 65(1):63-75.
- Richardson AE, Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiology* 156(3):989-996.
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17(4):319-339.

- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Fierer N (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4(10):1340.
- Schroth G (Ed.) (2004). *Agroforestry and biodiversity conservation in tropical landscapes*. Island Press.
- Silva SDA, de Queiroz DM, Ferreira WPM, Corrêa PC, Rufino JLDS (2016) Mapping the potential beverage quality of coffee produced in the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(9):3098-3108.
- Silva UC, Mendes GO, Silva NMRM, Duarte JL, Silva IR, Tótola MR, Costa MD (2014) Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. *Plos One* 9(10): e110246.
- Soto RL (2016) *Nematodes as Soil Quality Indicators in Coffee Systems*. The Netherlands. *Dissertação (Mestrado em Farming Systems Ecology)* - Wageningen University.
- Souchie EL, Abboud ACS, Caproni AL (2007) Solubilização de fosfato in vitro por microorganismos rizosféricos de guandu. *Bioscience Journal* 23(2).
- Sylvester-Bradley R, Asakawa N, Torraca SL, Magalhães FMM, Oliveira LA, Pereira RM (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica* 12(1):15-22.
- Vainio EJ, Hantula J (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104(8):927-936.
- Valášková V, Baldrian P (2009) Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant Soil Environmental* 55(10):413-423.
- Van Geel M, Ceustermans A, Van Hemelrijck W, Lievens B, Honnay O (2015) Decrease in diversity and changes in community composition of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of apple trees with increasing orchard management intensity across a regional scale. *Molecular Ecology* 24:941-952
- Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I (2006) Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(2):137-144.

- Verbruggen E, Van Der Heijden MG, Weedon JT, Kowalchuk GA, Roeling WF (2012) Community assembly, species richness and nestedness of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Molecular Ecology* 21(10):2341-2353.
- Wright AL (2009) Phosphorus sequestration in soil aggregates after long-term tillage and cropping. *Soil and Tillage Research* 103(2):406-411.
- Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilman D (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?. *Ecology* 84(8):2042-2050
- Zhang H, Kovar JL (2009) Fractionation of soil phosphorus. *Methods of phosphorus analysis for soils, sediments, residual, and waters*. 2nd ed. Blacksburg: Virginia Tech University, 50-60.

CAPÍTULO 2

Solubilização de fontes de fosfato por micro-organismos nativos de solos de cafezais agroecológicos.

RESUMO

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato tem a capacidade de converter formas insolúveis de fósforo (P) a aquelas solúveis, permitindo maior disponibilidade às plantas. Diversos fatores interferem no potencial de solubilização desses micro-organismos, como manejo, fontes de P utilizada e dinâmica do P no solo. Assim esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de solubilização de diferentes fontes de fosfato por micro-organismos nativos de cafezais agroecológicos e frações de P do solo. Os tratamentos avaliados foram três diferentes manejos de cafezais agroecológicos oriundos da Zona da Mata-MG (*Coffea arabica* L., variedade Catuaí vermelho): Cafezal – (SAF_{CF}) SAF (sistemas agroflorestais), com cama de frango; (PS_{CF}) pleno sol, com cama de frango e (SAF_{NA}) SAF, com adubação natural. Realizou-se a caracterização química dos solos, a avaliação do potencial de solubilização de diferentes fontes inorgânicas de P ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 e fosfato natural de Araxá) e da atividade enzimática das fosfatases ácidas e alcalinas, além do fracionamento sequencial de P. O potencial de solubilização de fontes inorgânicas e natural de P pela microbiota nativa do solo não foi influenciado de forma significativa pelos diferentes manejos analisados. Contudo as fontes de P utilizadas interferiram, seguindo a tendência decrescente das médias $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{AlPO}_4 > \text{FePO}_4 > \text{P-Araxá}$ mostrada em outros trabalhos, confirmando que os mecanismos da solubilização de fosfato dependem tanto das espécies de fungos e bactérias quanto das diferentes fontes de fosfato. As médias obtidas nas análises das atividades enzimáticas de fosfatase ácida variaram entre 158,42; 270,42; 211,12 $\mu\text{g g de solo seco}^{-1}$, enquanto a fosfatase alcalina de 133,60; 158,32 e 76,43 para os respectivos tratamentos, SAF_{CF}, PS_{CF} e SAF_{NA}. Analisando o somatório (P-soma) das frações obtidas pelo fracionamento sequencial de P, os cafezais sob SAFs apresentaram as maiores concentrações de P, sendo o SAF_{CF} em torno de duas vezes mais que o SAF_{NA}. A maior fração foi P-residual, que foi a única que diferiu estatisticamente entre os tratamentos, sendo maior nos cafezais sob SAFs.

Palavras-chave: micro-organismos solubilizadores de P; P inorgânico; fosfatases; fracionamento sequencial de P, manejos agroecológicos.

ARTICLE 2

Potential of solubilization of different phosphate sources by microorganisms native to coffee soils subjected to agroecological management.

ABSTRACT

Phosphate solubilizing microorganisms have the ability to convert insoluble forms of phosphorus (P) to soluble ones, allowing greater availability to plants. Several factors interfere in the potential solubilization of these microorganisms, such as management, P sources used and soil P dynamics. Thus, this work had as objective to evaluate the potential of solubilization of different sources of phosphate by native microorganisms of agroecological coffee plantations and fractions of P of the soil. The treatments evaluated were three different management of agroecological coffee plantations from the Zona da Mata-MG (*Coffea arabica* L., Catuaí red variety): Cafetal (SAF_{CF}) SAF (agroforestry systems) with chicken bed; (PS_{CF}) full sun, with chicken bed and (SAF_{NA}) SAF, with natural fertilization. The chemical characterization of soils, the evaluation of the solubility potential of different inorganic sources of P ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 and Araxá natural phosphate), enzymatic activity of acid and alkaline phosphatases and sequential fractionation of P. The potential of solubilization of inorganic and natural sources of P by native soil microbiota was not significantly influenced by the different treatments analyzed. However, the sources of P used interfered, following the downward trend of the $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{AlPO}_4 > \text{FePO}_4 > \text{P-Araxá}$ averages shown in other works, confirming that the mechanisms of phosphate solubilization depend on fungal and bacterial species as well as on different sources of phosphate. The means obtained in the analyzes of the enzymatic activities of acid phosphatase varied between 158.42; 270.42; 211.12 $\mu\text{g g of dry soil}^{-1}$, while the alkaline phosphatase of 133.60; 158,32 and 76,43 for the respective treatments, SAF_{CF}, PS_{CF} and SAF_{NA}. Analyzing the summation (P-sum) of the fractions obtained by sequential fractionation of P, coffee plants under SAFs presented the highest P concentrations, with SAF_{CF} around twice as high as SAF_{NA}. The largest fraction was P-residual, which was the only one that differed statistically among the treatments, being higher in the coffee plantations under SAFs.

Keywords: microorganisms solubilizers of P; Inorganic P; phosphatases; sequential fractionation of P, agroecological management.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, apresentando diversas funções celulares, em especial ao participar da formação dos fosfolipídios e da formação de nucleotídeos (ATP), utilizado como unidade energética dos vegetais (Taiz & Zeinger, 2009). A fonte primária de fósforos são os minerais fosfatos que ao se intemperizarem são liberados aos solos e utilizados pelas plantas. Entretanto, de todo o P presente nos solos, estima-se que menos de 1 % esteja em forma disponível para as plantas (Mullen, 2005), também considerada fração lábil do P, pois está em equilíbrio com a solução do solo ou fracamente adsorvido pelas partes sólidas e é mais facilmente absorvido pelas plantas.

O P torna-se indisponível, ou não lábil, porque parte do P adicionado ou nativo do solo não permanece em solução, pois é rapidamente adsorvido pela fase sólida e fica indisponível para o uso imediato pelas das plantas (Novais e Smith, 1999). A adsorção ocorre por meio de ligações mais fortes com a fração mineral do solo, este grau de interação dificulta a dessorção do P para solução do solo, caracterizando as formas não lábeis (Novais & Smith, 1999). A fração não-lábil é, portanto, de mais difícil recuperação do solo.

Em solos intemperizados e ácidos, como nos Latossolos, essa adsorção ocorre especialmente em óxidos de ferro e alumínio, podendo o P ser fixado tanto na superfície desses minerais como também com o tempo, difundir-se para o interior dessas partículas (P-ocluído), o que dificulta ainda mais seu acesso pela planta. Outra característica que torna o P inacessível às plantas é a possibilidade de precipitar com cátions como o cálcio (Ca^{2+}) em solos neutros ou calcários, ou mesmo com Fe^{3+} e Al^{3+} em solos ácidos, formando assim fosfatos pouco solúveis (Novais & Smyth, 1999). Estes fosfatos fixados à fração mineral ou precipitados são considerados inorgânicos

O P no solo ocorre tanto na forma inorgânica, sob várias formas ou frações, como também na forma orgânica. A matéria orgânica do é um importante reservatório de P imobilizado, sendo responsável por 20 a 80 % de P em solos (Nash, 2014). Por meio da atividade das enzimas fosfatases, plantas e micro-

organismos utilizam P de fontes orgânicas quase tão eficientemente como de fontes minerais, dada à hidrólise de P-orgânico, liberando P-inorgânico (Tarafdar & Claassen, 1988; Caldwell, 2005). Essas enzimas são amplamente distribuídas nos solos e podem ser classificadas conforme seu pH ótimo de ação como ácidas (pH 6,5) ou alcalinas (pH 11) (Tabatabai, 1994).

A partir de formas de P inorgânico como de P orgânico ocorre a formação de P lábil ou não-lábil, sendo este último mais dificilmente recuperado do solo. Se o P se encontra em equilíbrio com a solução do solo ou fracamente adsorvido, considera-se que esta é a forma lábil. Entretanto, quando a adsorção ocorre por meio de ligações mais fortes, este grau de interação dificulta a dessorção do P para solução do solo, caracterizando as formas não lábeis (Novais & Smith, 1999).

Para identificar as diferentes frações de P do solo, utiliza-se a técnica de fracionamento de P utilizando diferentes extratores químicos sequencialmente em uma mesma amostra (Santos et al., 2008). A metodologia do fracionamento parte do princípio de remover inicialmente as frações mais disponíveis até as mais estáveis de forma sequencial, uma vez que as frações apresentam diferentes estados de energia (Chang & Jackson, 1957; Hedley et al., 1982; Zhang & Kovar, 2009). As formas de labilidade e disponibilidade de P no solo variam conforme fatores climáticos, propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo e a atividade microbiana, os quais imobilizam ou liberam P na solução, dinâmica que ainda é também afetada pelo manejo do solo (Santos et al., 2008).

Algumas práticas de manejo que aumentam a diversidade do solo têm sido propostas com o objetivo de aumentar a disponibilidade de P para as plantas e a recuperação do P adsorvido pelo solo. Isto possibilita a redução da dependência de fertilizantes fosfatados na agricultura. As fontes fosfáticas são limitadas e o gasto energético envolvido na sua produção e utilização é enorme, além do que se estima que os fosfatos acumulados ao longo dos anos nos solos agrícolas são suficientes para sustentar a agricultura por cerca de 100 anos (Goldstein et al., 1986).

Dentre essas práticas que visam o aumento da disponibilidade e da recuperação do P nativo dos solos, o uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato tem sido tema recorrente nos últimos anos (Sharma et al., 2013). Esse grupo

de micro-organismos é capaz de converter formas insolúveis, tanto orgânicas e inorgânicas de P, em compostos solúveis por meio de vários mecanismos, principalmente em decorrência da produção de ácidos orgânicos (Richardson, 2001; Mendes et al., 2014).

Na discussão da potencialidade do uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato deve-se considerar o fato de que diferentes fontes de fosfatos também influenciam a capacidade solubilizadora desses micro-organismos do solo (Nahas & Assis, 1992; Mendes et al., 2014). Neste mesmo contexto, nota-se que o manejo do solo e da produção também influencia diretamente a diversidade de micro-organismos do solo.

Na região da Zona da Mata de Minas Gerais, onde o café é o principal produto comercial, a introdução de sistemas agroflorestais agroecológicos (SAFs) nas lavouras cafeeiras tem sido associada ao oferecimento de múltiplos serviços. Dentre eles, destacam-se a qualidade do solo - por contribuir para a melhoria da fertilidade; menores perdas de solo e de nutrientes pela erosão - o que mostra o grande potencial da prática para a conservação do solo; maior sustentabilidade aos agricultores (Cardoso et al, 2001; Mendonça et al., 2001); como também aumentando a diversidade biológica, devido à manutenção das inter-relações de alimentação existentes entre os integrantes de um ecossistema (Soto, 2016).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de solubilização de diferentes fontes de fosfato de micro-organismos nativos presentes em solos de cafezais submetidos a manejo agroecológico orgânicos, sob sistemas agroflorestais ou a pleno sol.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado durante a safra de fevereiro de 2017 de *Coffea arabica* L. da variedade Catuaí Vermelho, em Araponga, na região da Zona da Mata mineira. A região possui altitude em torno de 1.315 m, onde predominam solos classificados como Latossolo Vermelho Amarelo (Embrapa, 2013), temperatura média anual de 18 °C e precipitação média anual de 1.500 mm, com períodos de seca de dois a quatro meses (Cardoso et al., 2001).

Os sistemas de produção avaliados são provenientes de propriedades da agricultura familiar, conduzidas com manejo agroecológico, localizadas próximas a região conhecida como Pedra Redonda (20°38'39.76"S, 42°30'0.27"W). O potencial de solubilização microbiana de fósforo e a atividade de fosfatases ácidas e alcalinas de solo foram avaliados em solos de cafezais agroecológicos submetidos a três áreas com diferentes sistemas de manejo, considerados neste estudo como tratamentos. O primeiro manejo era uma área de café em sistema agroflorestal (SAF_{CF}), com adubação orgânica com cama de frango, resíduos vegetais, casca de café e adição de fósforo natural reativo. O segundo era uma área de café cultivado em monocultivo (PS_{CF}), com adubação orgânica com cama de frango, resíduos vegetais, casca de café e aplicação periódica de fósforo natural reativo. E o terceiro manejo, a área era de um café em sistema agroflorestal natural (SAF_{NA}), manejada seguindo os princípios da agricultura natural (Fukuoka, 1995) aduba-se com resíduos vegetais, casca de café e serapilheira da própria área e do fragmento de mata próximo. Este último manejo não recebe nenhum insumo químico ou adubação orgânica de origem animal.

As três áreas são próximas e de características semelhantes quanto a solo, relevo e exposição à radiação solar. As características das áreas estudadas estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos cafezais agroecológicos estudados.

Local	SAF _{CF}	PS _{CF}	SAF _{NA}
Adubação	Cama de frango e resíduos vegetais, casca de café, fosfato natural reativo.	Cama de frango, resíduos vegetais, casca de café, fosfato natural reativo.	Resíduos vegetais, casca de café e serapilheira.
Adubação (kg/planta)	4	4	10
Espaçamento	3,0 x 1,5	3,0 x 1,5	2,3 x 1,2
Idade (anos)	16	12	3
Plantas de café/ha	1000	4000	1000
Área (ha)	4	0,3	0,8
Árvores presentes	sim	não	sim
Amendoim forrageiro como cobertura	sim	não	sim

Baseado na caracterização de Soto (2016) e Vieira Júnior (2016).

Amostragem

Para cada tratamento foram coletadas três amostras compostas de solo, na profundidade de 0-20 cm, sendo cada amostra formada por oito subamostras simples coletadas com trado sonda ao redor de quatro plantas de café próximas, selecionadas ao acaso dentro da área (Figura 1). As amostras foram submetidas às análises químicas e microbiológicas. A caracterização física foi realizada previamente por Soto (2016, Tabela 2).

Após a coleta das amostras de solo, uma porção foi rapidamente transferida para sacos plásticos limpos, identificados e transportada para o Laboratório de Ecologia Microbiana em caixas de isopor com gelo e imediatamente armazenada a 4 °C, sendo destinada às análises microbiológicas e enzimáticas. As análises dos indicadores microbiológicos foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) e no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Da outra porção de cada amostra composta, uma parte foi encaminhada

para o laboratório de rotina do Departamento de Solos, para análise química do solo e, outra parte foi destinada à análise de fracionamento sequencial de P.

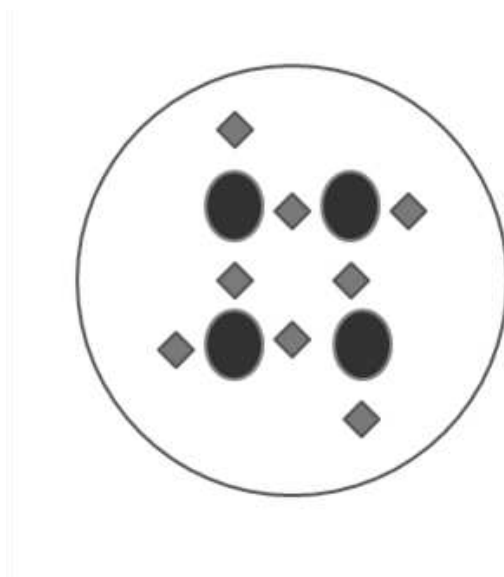


FIGURA 1. Padrão de amostragem por local de amostragem. Os círculos representam cada planta de café, enquanto os losangos representam cada ponto de amostragem, profundidade de 0-20 cm.

Tabela 2. Caracterização física do solo das áreas de estudo, segundo Soto (2016).

Trat.	Argila	Silte	Areia	Classe Textural	DS kg dm ⁻³	----- m ³ m ⁻³ -----		
						Mi	Ma	PT
SAF _{CF}	45	12	43	Argilosa	1,16	0,29	0,21	0,51
PS _{CF}	48	10	42	Argilosa	0,97	0,29	0,21	0,50
SAF _{NA}	49	9	42	Argilosa	0,97	0,27	0,24	0,51

Médias seguidas de mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Solubilização potencial de diferentes fontes de fosfato

O potencial de solubilização de P pela microbiota nativa do solo foi avaliado de acordo com método estabelecido por Debnath et al. (1994), com modificações de Massenssini et al. (2015). De forma resumida, 1,6 g de solo úmido de cada um

dos manejos avaliados foram incubados em tubos Falcon de 50 ml (previamente lavados em ácido HCl (2%), contendo 25 ml de meio de cultura NBRIP líquido (Nautiyal, 1999) e 25 mg de diferentes fontes de P. O pH da solução foi avaliado antes da incubação. As fontes insolúveis de P utilizadas foram: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 , FePO_4 , além de uma fonte natural de baixa reatividade (Fosfato de Araxá, 24 % de P_2O_5). Os tubos ficaram incubados a 28 °C por 15 dias sob agitação a 160 rpm. Amostras controle, sem a adição de P, também foram preparadas e incubadas.

Uma vez finalizada a incubação após a decantação e filtragem da suspensão, recolheu-se os sobrenadantes para a determinação de P e pH. O teor de P obtido nos extratos pelo método colorimétrico (Braga & DeFelipo, 1974) foi considerado como o P solubilizado pelos micro-organismos nativos do solo.

O experimento foi analisado considerando um delineamento em blocos casualizados, na forma de um fatorial 3 x 5, correspondente aos três manejos avaliados e às cinco fontes de P (quatro fontes + controle sem P), com 3 repetições.

Avaliação da atividade das fosfatases ácidas e alcalinas

A avaliação da atividade das fosfatases seguiu metodologia desenvolvida por Tabatabai (1994). O método tem como princípio a estimativa colorimétrica do p-nitrofenol liberado quando o solo é incubado com solução tamponada p-nitrofenil fosfato e tolueno. O procedimento considera que o p-nitrofenol liberado pela atividade da fosfatase desenvolve uma cor estável (em pH alcalino) que é relacionada à recuperação quantitativa do p-nitrofenol adicionado ao solo.

A determinação foi realizada incubando 1 g de solo (peso úmido) em tampão (MUB) em tubos de ensaio, ao qual se adicionaram 0,2 mL de tolueno, 4 mL de MUB (MUB pH 6,5 para a análise ácida e MUB a pH 11 para a análise alcalina) e 1 mL de solução 0,05 mol L⁻¹ de p-nitrofenil fosfato. Os tubos foram agitados em agitador vortex por 30 s, vedados com Parafilm M® e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h. A reação foi interrompida adicionando-se 1 mL de CaCl_2 0,5 mol L⁻¹ e 4 mL de NaOH. Os tubos foram novamente agitados por 30 s antes da suspensão de solo ser filtrada através de papel de filtro quantitativo. A intensidade da cor amarela do filtrado foi determinada por colorimetria em espectrofotômetro (Femto - Mod.

600S), no comprimento de onda de 420 nm. A concentração de p-nitrofenol foi calculada a partir de gráfico da curva de calibração resultante dos dados dos padrões de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de p-nitrofenol (Martins, 2015).

Fracionamento de P

O fracionamento químico de P foi efetuado conforme descrito por Zhang e Kovar (2009). As frações de P obtidas por esse fracionamento são o resultado do tratamento das amostras de solos com soluções sequenciais com aumento da força, a fim de solubilizar P da forma mais lábil a formas mais estáveis. O solo remanescente em um passo é utilizado na extração seguinte e assim sucessivamente. As frações são P-lábil, P-Al, P-Fe, P-ocluído, P-Ca e P-residual, extraídas por NH_4Cl , NH_4F , NaOH , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + \text{NaHCO}_3$ (pH 8,5) + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionito de sódio), H_2SO_4 e por digestão triácida, respectivamente.

Para o fracionamento, 0,7 g de solo (TFSA) foram pesados e dispostos em tubos de centrífuga de 50 mL, onde foram adicionadas, de forma individual, as soluções de extração (Tabela 3) em cinco etapas. As soluções de extração foram adicionadas na seguinte ordem: NH_4Cl 1,0 mol L^{-1} , NH_4F 0,5 mol L^{-1} (pH 8,2), NaOH 0,1 mol L^{-1} , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + \text{NaHCO}_3$ (pH 8,5) + 0,7 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionito de sódio) e, por último, H_2SO_4 0,25 mol L^{-1} . Os tubos de centrífuga, exceto na quarta extração, foram agitados em agitador alternativo ajustado a 100 rpm por minuto durante 30 min na primeira, 1 h na segunda e quinta e 18h na terceira extração. Em todas as etapas os tubos foram centrifugados a 9500 rpm por 5 min. Após cada extração, exceto na primeira, realizou-se duas lavagens do resíduo com NaCl 0,5 mol L^{-1} e completaram-se os volumes dos balões utilizados. Na sequência, o sobrenadante foi recolhido passado por membrana de celulose (0,20 μm), sendo então armazenando até posterior análise dos teores de P.

Digestão triácida (EPA 3052) para a quantificação do P-residual foi realizada no resíduo restante das extrações e também para se avaliar o teor de P-total da amostra original do solo de cada tratamento. O P-total foi considerado como o somatório das frações obtidas pelo fracionamento e o obtido na fração residual. Todas as concentrações de P nos extratos foram determinadas por ICP-OES.

Análise estatística

Na análise dos dados obtidos foram desdobradas as interações manejo e fontes de P, independente da significância na ANOVA. Quando necessário, as médias dos tratamentos para os diferentes atributos avaliados foram comparados por teste de média Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software estatístico Sigma Plot 12.5. Quando necessária, a normalização dos dados foi efetuada utilizando-se log 10. Na avaliação do resultado do fracionamento sequencial de P, a análise de variância foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e os tratamentos comparados pelo método de comparação múltipla de Dunn's, com diferenças significativas a 0,1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de rotina da química do solo

As características químicas dos solos estudados (Tabela 3) e analisadas seguindo recomendações de CFSEMG (1999). Os solos dos tratamentos com SAFs apresentaram valores de pH levemente superiores aos do cafezal PS_{CF}. Quando compara-se o cafezal em SAF com o monocultivo, ambos com mesmo tipo de adubação orgânica, o primeiro apresenta pH bom enquanto o segundo com pH baixo. Os resultados dos teores de Ca²⁺ seguem a mesma tendência apresentada pelo pH, com maiores teores associados ao SAF_{CF}, seguido do SAF_{NA} e PS_{CF}. Entretanto, no caso específico do Ca²⁺, os teores nos solos dos três sistemas avaliados é considerado bom. Os teores de matéria orgânica do solo são considerados altos em todas as áreas, seguindo a mesma linha decrescente: SAF_{CF} > SAF_{NA} > PS_{CF}.

No solo do SAF_{NA}, a quantidade de P disponível é inferior em relação aos demais sistemas, sendo quase 8 vezes menor do que no SAF_{CF} e 11 vezes no cafezal PS_{CF}. Essa concentração muito baixa (CFSEMG, 1999) em SAF_{NA} é relacionada com a ausência de adubação orgânico e, ou mineral, enquanto nos demais sistemas

verifica-se a adição de fosfato natural, o que eleva as concentrações de P a serem consideradas muito boas.

Nas análises de K, Mg^{2+} , acidez trocável (H+Al), soma de bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC) efetiva (t), CTC total (T) e saturação de bases (%V), os resultados seguem a mesma tendência do P, porém com diferenças bem menores. A tendência geral é a ordem decrescente $PS_{CF} > SAF_{CF} > SAF_{NA}$, com classificação bom ou muito bom para todos esses critérios, a exceção de %V que está abaixo do limite considerado bom. O teores de P-rem e a acidez potencial (H+Al) apresentam valores semelhantes entre os tratamentos.

TABELA 3. Análise química de solo para todos os sistemas de estudo.

Trat.	pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	MO	P-rem
	H ₂ O	mg/dm ³					cmol _c /dm ³				-- % --		dag/kg	µg/L
SAF _{cf}	5,6	31,4	326	3,8	1,6	0	7,3	6,2	6,2	13,5	46	0	8,0	20,1
PS _{cf}	5,2	47,3	517	3,3	1,8	0	7,4	6,5	6,5	13,9	47	0	7,2	26,7
SAF _{na}	5,3	4,2	197	3,6	1,4	0	7,3	5,5	5,5	12,8	43	0	7,6	20,9

SB: Soma das bases; t: capacidade de troca catiônica efetiva, T: capacidade de troca catiônica a pH 7,0; V: percentagem de saturação de bases; m: percentagem de saturação por alumínio, MO: matéria orgânica; P-rem: fósforo remanescente.

Solubilização potencial de diferentes fontes de fosfato

O potencial de solubilização de fontes inorgânicas de P pela microbiota nativa do solo não foi influenciada pelos diferentes manejos agroecológicos adotados. Entretanto, a natureza da fonte interferiu na grandeza do potencial de solubilização, seguindo-se a tendência decrescente $Ca_3(PO_4)_2 > FePO_4 = AlPO_4 > P$ -Araxá. A influência da fonte de P juntamente com a presença e diversidade de espécies de fungos e bactérias são importantes no processo de solubilização de fosfato (Mendes et al., 2014; Massenssini et al., 2015).

O pH do meio de cultura é alterado com a adição das amostras de solo e variações foram verificadas com as diferentes fontes de P (Tabela 4). Enquanto que a adição dos fosfatos de Fe e Al proporcionou a queda do pH, a adição do $Ca_3(PO_4)_2$

determinou o aumento desta variável. A adição do fosfato de Araxá, por sua vez, não implicou em variação no pH em relação ao controle. Finalizada a incubação, todos os tratamentos causaram queda nos valores de pH, indicando a acidificação do meio. Comparando as amostras contendo solos dos diferentes manejos, o sistema em SAF_{NA} apresentou-se pH maior, exceto na presença de FePO₄.

Tabela 4. Valor do pH depois da incubação na avaliação do potencial de solubilização de diferentes fontes de fosfato

Tratamento	P-Ca	P-Al	P-Fe	P-Araxá	Cr
SAF_{cf}	4,30 Aa	3,63 Aa	4,10 Aa	4,08 Aa	3,91 Aa
PS_{cf}	4,02 Aa	3,62 Ab	3,84 Ab	4,06 Ab	3,90 Ab
SAF_{na}	4,40 Aa	3,85 Ba	3,85 Ba	4,28 ABa	4,31 Aba

Na coluna, analisando a fonte de fosfato, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si. Na linha, dentro da mesma área, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %. Cr = controle (sem P).

Os resultados obtidos no presente estudo (Tabela 5) guardam similaridade com a ordem de potencial de solubilização de outros trabalhos quanto às fontes utilizadas, mas revelam-se inferiores quando comparados com os dados de Massenssini et al. (2015), que analisaram a solubilização de diferentes fontes de P por micro-organismos nativos de solos de eucalipto. Essa diferença pode ser associada ao manejo, as peculiaridades de cada solo e à influência das associações micorrízicas com a cultura do eucalipto.

A solubilização de P utilizando a fonte Ca₃(PO₄)₂ apresentou diferença estatística (p<0,05) quando comparado com as demais fontes, sendo superior em todos os tratamentos, apenas na área a pleno sol que não foram encontradas diferenças significativas entre fosfato de Ca e Fe (Tabela 5). Os teores solubilizados na presença de fosfato de Ca pelos micro-organismos representaram 5,78; 9,93 e 6,74 % do P adicionado nos manejos SAF_{CF}, a pleno sol orgânico e SAF_{NA}, respectivamente. Esses dados indicam que a microbiota solubilizadora foi mais estimulada quando utilizada essa fonte, corroborado com Massenssini et al. (2015). O fosfato natural de Araxá apresentou os menores valores de solubilização.

Tabela 5. Potencial de solubilização de diferentes fontes de fosfato em solos sob cafezais agroecológicos

Tratamento	P-Ca	μg de P		
		P-Al	P-Fe	P-Araxá
SAF _{cf}	285,64 Aa	30,84 Ab	49,43 Ab	10,88 Ac
PS _{cf}	493,70 Aa	30,33 Ab	98,41 Aab	10,16 Ab
SAF _{na}	334,69 Aa	14,76 Ab	43,01 Ab	10,19 Ab

Na coluna, analisando a fonte de fosfato, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si. Na linha, dentro da mesma área, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Os mecanismos que podem atuar na solubilização de fosfato por micro-organismos do solo é a liberação de prótons (H⁺) durante o crescimento celular (Illmer & Schinner, 1995ab) e a produção de ácidos orgânicos que são produzidos nos solos, como glicônico, glucônico, oxálico, malônico, cítrico, por plantas e micro-organismos, esse último mecanismo têm sido considerado capazes de aumentar a disponibilidade de P para plantas (Illmer & Schinner, 1992; Halder et al., 1990; Kpombrekou-A & Tabatabai, 1994; Rodríguez & Fraga, 1999). Ambos os mecanismos relacionados de alguma maneira com a variação do pH no meio (Arcand e Schneider; Liaud et al., 2014).

Ao avaliarem quatro isolados fúngicos *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Penicillium islandicum* e *Eupenicillium ludwigii* Mendes et al. (2014) observaram os mecanismos de solubilização de fosfato e concluíram que com a fonte de fosfato de Ca foi observado que o mecanismo principal de solubilização de fosfato de Ca está relacionado ao pH. A redução do pH aumenta a solubilização de fosfato (Mendes et al., 2015).

Nos meios de cultura contendo fontes de fosfatos naturais de rocha (Araxá e Catalão), o ácido orgânico mais produzido foi o glucônico. Entretanto, esse ácido não se mostrou eficiente em solubilizar fosfato, obtendo-se baixos valores de solubilização, os quais ainda não se correlacionaram com a produção do ácido e nem com pH. No presente estudo (Tabela 4) também os valores de pH não se correlacionaram com as concentrações de P obtidas pela solubilização de fosfato de

Araxá (Tabela 4). A baixa solubilização dos fosfatos de rocha podem estar relacionadas com a liberação de outros elementos durante a solubilização, como estudado por Mendes et al. (2014) e Silva et al. (2014). Um dos elementos inibitórios encontrados no processo da solubilização é o fluoreto, o que pode ser enfrentado pela adição direta de ácidos orgânicos mais eficientes ao solo (Bolan, 1994) ou com a presença de uma microbiota mais diversa no solo.

A secreção de ácido orgânico influenciou diretamente os isolados estudados por Mendes et al. (2014) quando utilizando a fonte FePO_4 e AlPO_4 . Esse mecanismo também pode responder nossos resultados, uma vez que não houve relação entre o pH e solubilização de fosfato.

Os valores menores de solubilização de fontes de P-Al e P-Fe quando comparado com a fonte de P-Ca podem estar relacionados a menor reatividade dos fosfatos de Fe e Al. Dessa forma pode-se afirmar que a microbiota do solo estudo utiliza mais de um mecanismo para a solubilização de diferentes fontes de P.

Avaliação da atividade das fosfatases ácidas e alcalinas

Na Figura 3 encontram-se os valores de fosfatase ácida e alcalina para os solos sob diferentes manejos. Os valores encontrados para todos os tratamentos no presente estudo mostraram-se dentro da faixa ideal de atividade dessas enzimas (Nunes et al., 2011; Massenssini et al., 2015). Isto pode indicar que o reservatório de P orgânico nesses solos manejados agroecologicamente é importante na ciclagem desse nutriente. O P pode ser liberado a partir de compostos orgânicos do solo pela atividade de enzimas, em especial das fosfatases ácidas, que predominam em solos tropicais, dado seus baixos valores de pH (Gharu & Tarafdar, 2016). Essa é uma das razões que explica a atividade da fosfatase alcalina ser inferior à da fosfatase ácida em todos os tratamentos avaliados (Figura 3).

O solo do cafezal a pleno sol orgânico apresentou as maiores atividades de fosfatase ácida ($158,4 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco) e alcalina ($133,6 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco), enquanto os dois cafezais sob SAF não diferiram entre si ($p < 0,05$).

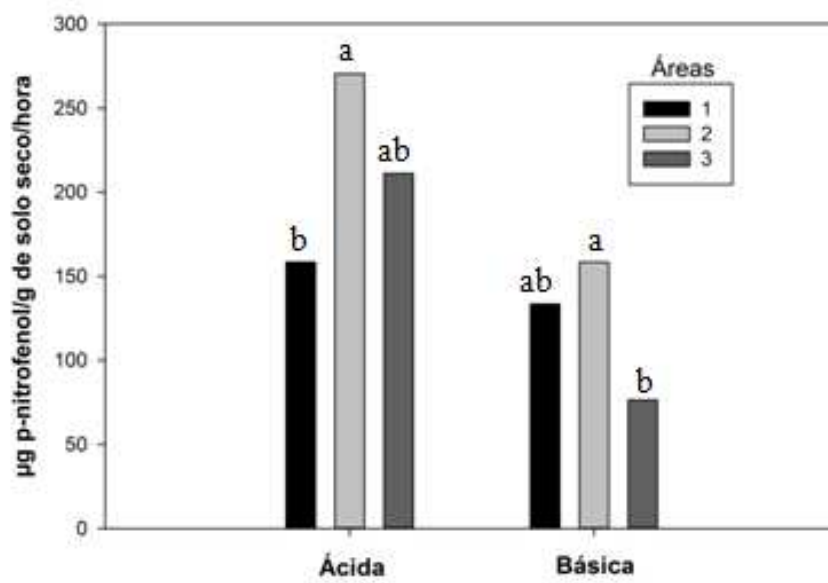


FIGURA 3. Atividade de fosfatase ácida e alcalina, nos cafezais agroecológicos, onde 1, 2 e 3 representam cafezal sob SAF_{CF}, PS_{CF} e SAF_{NA}, respectivamente.

Esses resultados não estão condizentes com a literatura (Venkatesan & Senthurpandian, 2006; Dornbush, 2007), visto que o teor matéria orgânica e presença de serapilheira não contribuíram para a atividade das fosfatases. Nos sistemas cultivados, a atividade enzimática após a adição adubação orgânica de origem animal foi maior que a das culturas que não receberam adubação (Kataoka et al., 2017). Outros fatores que podem afetar a atividade das fosfatases, como no nosso trabalho que foi observado a diferença entre os tratamentos que receberam a mesma adubação pode estar relacionada à composição microbiológica do solo, assim como a degradabilidade dos compostos orgânicos e vegetais, alguns como os ácidos nucleicos, fosfolípidos, são mais facilmente decompostos devido à estrutura de suas moléculas, enquanto os ortofosfatos de monoésteres são decompostos mais lentamente (Novais & Smith, 1999) afetando na capacidade de mineralização do P orgânico. A diversificação de espécies arbóreas pode contribuir para a diferença da dinâmica de liberação de nutrientes, podendo apresentar materiais que produzem serapilheira de decomposição lenta ou rápida (Duarte et al., 2013).

A atividade enzimática no solo é essencial para o entendimento de diversos processos que nele ocorrem. Dentre esses, a dinâmica do P orgânico e atividade de decomposição da matéria orgânica é influenciada pela fosfatase, importante enzima do ciclo do P no solo (Taylor et al., 2002; Margalef, 2017).

Fracionamento de P

O P total determina o tamanho do reservatório desse nutriente para as plantas, podendo o mesmo estar em formas lábeis ou não lábeis. Os cafezais sob SAFs apresentaram as maiores concentrações de P-total (Tabela 6). O SAF_{CF} apresentou aproximadamente o dobro do P-total em relação aos demais sistemas de manejo. A idade do sistema pode ser um dos motivos para esse resultado, uma vez que sistemas mais velhos tendem a ter maiores concentrações de P total (Cardoso et al., 2003), assim como da adição de fosfato natural no cafezal sob SAF_{CF}. Porém o histórico da área também pode contribuir para esse resultado (Vieira et al., 2016).

Os resultados de P total obtido para o solo de SAF_{CF} do presente estudo foram semelhantes aos verificados em cafezais agroecológicos também sob sombra na mesma região da Zona da Mata de Minas Gerais. Sem considerar o P-residual, Cardoso et al. (2003) verificaram teor total de P entre 381 a 493 mg kg⁻¹, e Xavier et al. (2011), considerando o P-residual, encontraram entre 879,3 a 971,5 mg kg⁻¹.

Entretanto, quando se compara os teores de P-total obtidos no cafezal a pleno sol (PS_{CF}), verificam-se valores inferiores aos obtidos pelos autores anteriormente citados, que utilizaram outro procedimento de fracionamento químico. Tal diferença pode ser relacionada, além do método analítico diferenciado, à adição da cama de frango. No entanto, a sequência de predomínio das diferentes frações obtida foi semelhante ao verificado por aqueles autores.

A estimativa do P-total obtida por digestão triácida foi similar com a concentração total de P obtida pela soma das frações (Tabela 6), indicando a efetiva quantificação do fracionamento químico.

TABELA 6. Fracionamento sequencial de P em amostras referentes aos três sistemas de manejo estudados.

Frações de P (mg P kg solo ⁻¹)	Tratamentos					
	SAF _{CF}		PS _{CF}		SAF _{NA}	
P-lábil	43,73	aBC	8,78	aC	5,26	aB
P-Al	112,14	aB	78,11	aBC	35,55	aBC
P-Fe	142,89	aB	90,51	aB	59,67	aB
P-ocluo	72,43	aAB	65,51	aABC	43,14	aABC
P-Ca	2,33	aC	31,03	aAB	0,00	aC
P-residual	489,84	aA	107,16	bA	343,16	abA
P-total 1*	863,36		381,11		486,78	
P-total 2**	1004,12	aD	381,52	bD	494,93	bD
Coefficiente de correlação (p>0,05) entre P-total 1 e fosfatase ácida	-0,9987					

*. P-soma = P-disponível + P-Al + P-Fe + P-ocluo + P-Ca + P-residual

** . P-total obtido pela extração por digestão total, sem passar por outras extrações.

Na coluna, em cada tratamento, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo mesmo teste.

Não se verificaram diferenças ($p < 0,01$) entre as concentrações de P das diferentes frações avaliadas, exceto para o P-residual, que foi maior no cafezal sob SAF_{CF} e menor no PS_{CF}. O P de todos os cafezais agroecológicos foram principalmente associados à fração P-residual, o que também foi observado em solos semelhantes (Araújo et al., 2004; Xavier et al., 2011) correspondendo a 56,7%, 28,1%, 70,5% do P-total nos cafezais sob SAF_{CF}, a PS_{CF} e sob SAF_{NA}, respectivamente (Figura 4). Em solos tropicais, as frações de P-residual tendem a ser maiores do que as demais frações (Guo et al., 2000) e geralmente o teor de P residual orgânico é maior que P residual inorgânico. Oberson et al. (1994) estudando diferentes manejos agrícola, semelhantes ao nosso estudo, observaram que setenta por cento do P residual total é P orgânico, e essa fração é a que mais se difere entre diferentes sistemas de cultivo mais do que a fração de P residual inorgânico, mostrando assim a importância da transformação do P residual.

Os teores de P residual apresentaram correlação negativa (-0,9987) (Tabela 6) com a atividade da fosfatase ácida, o que sugere que essa fração pode estar envolvida com transformações a longo prazo (Obserson et al., 1994).

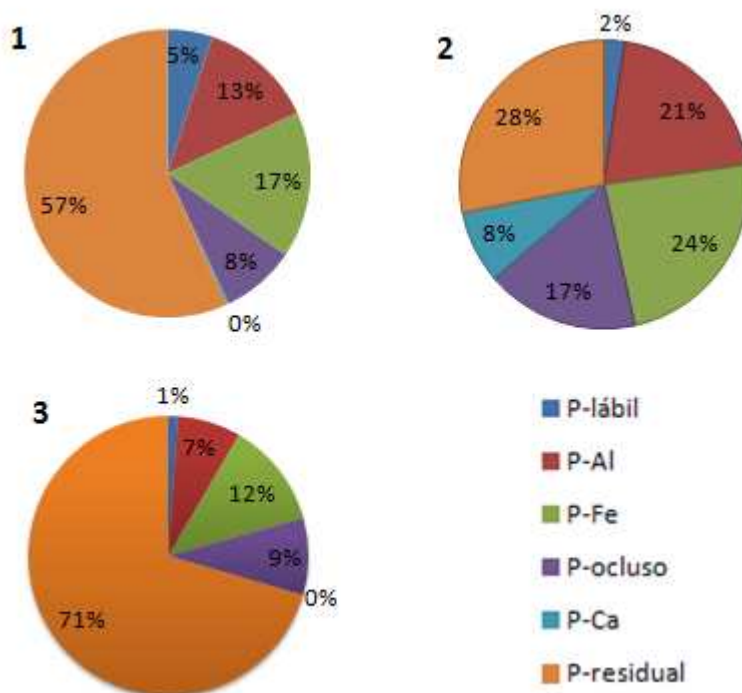


FIGURA 4. Porcentagem (%) das frações de P obtidas pelo fracionamento sequencial de P, sob os cafezais agroecológico sob SAF orgânico (1), a pleno sol orgânico (2) e sob SAF com adubação natural (3).

Nas áreas estudadas, os teores obtidos seguiram a sequência decrescente: P-residual > P-Fe > P-Al > P-Ocluso > P-lábil > P-Ca. Apenas em PS_{CF}, o P-Ca apresentou-se maior do que o P-lábil. Nos cafezais sob SAFs (SAF_{CF} e SAF_{NA}) os menores teores de P foram associados às formas associadas a Ca, o que também foi observado por Cardoso et al. (2003) e Xavier et al. (2011). Em solos tropicais, caracterizados pelo alto intemperismo e pH baixos, geralmente apresentam altas taxas de P ligados a óxidos de Fe e Al devido a alta capacidade de sorção do solo, resultando em baixas concentrações de P lábil (NH₄Cl), disponíveis para as plantas (Novais e Smith, 1999, Xavier et al., 2011).

No cafezal PS_{CF} as frações de P associadas a P-Al e P-Fe foram as que apresentaram maiores percentagens em relação a P-total. Verma et al. (2005) relataram que a aplicação de fertilizantes minerais pode favorecer essas frações de P no solo e, como observado por Cardoso et al. (2003), esse aumento pode estar relacionado também com a mineralização do P-orgânico presente nessa fração.

Embora as concentrações de P-orgânico em cada fração sejam desconhecidas neste trabalho, às análises da atividade das fosfatases indicam que, pelo menos uma parte do P-orgânico pode ser mineralizada pela atividade enzimática, podendo ser considerada como uma fonte lábil (Gharu & Tarafdar, 2016). Em sistemas sob SAF, a quantidade de P orgânico tende a diminuir menos com a profundidade do solo do que sistemas em monocultivo, além de apresentarem proporções maiores de P orgânico, quando comparado com P-inorgânico, indicando que em SAFs apresentam impacto maior na transformação de P em camadas mais profundas do solo (Cardoso et al., 2003). A imobilização e a mineralização de P pelos micro-organismos parecem ser os principais processos que regulam a ciclagem de P e a disponibilidade de material orgânico (Oberson & Joner, 2005) e como visto no Capítulo 1 os cafezais sob SAF apresentaram maior diversidade de bactérias e fungos totais.

O efeito dos sistemas agroecológicos na distribuição de P do solo e na ciclagem do P orgânico precisa ser melhor por estudado, levando também em consideração mudanças temporais. A abordagem do fracionamento sequencial do P no solo foi útil para apontar a disposição e dinâmica desse elemento, porém a variabilidade dos dados dificultou na interpretação dos resultados.

CONCLUSÃO

Solos de cafezais agroecológicos de diferentes manejos apresentam potencial semelhante de solubilização de diferentes fontes de fosfatos. Fontes de P ligadas a Ca são mais facilmente solubilizada nestes ambientes.

A forma predominante de P nos solos com cafezais sob sistemas agroecológicos é a fração P-residual, uma fonte de P de longo prazo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdala DB, da Silva IR, Vergütz L, Sparks DL (2015) Long-term manure application effects on phosphorus speciation, kinetics and distribution in highly weathered agricultural soils. *Chemosphere* 119:504-514.

Araújo M S, Schaefer CE, Sampaio EV (2004) Soil phosphorus fractions from toposequences of semi-arid Latosols and Luvisols in northeastern Brazil. *Geoderma* 119(3):309-321.

Arcand MM, Schneider KD (2006) Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78(4):791-807.

Bolan NS, Naidu R, Mahimairaja S, Baskaran S (1994) Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils* 18(4):311-319.

Braga JM, Defelipo BV (1974) Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. *Revista Ceres*.

Caldwell BA (2005) Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* 49(6):637-644.

Cardoso IM, Guijt I, Franco FS, Carvalho AF, Neto PF (2001) Continual learning for agroforestry system design: university, NGO and farmer partnership in Minas Gerais, Brazil. *Agricultural Systems* 69(3):235-257.

Cardoso IM, Janssen BH, Oenema O, Kuyper TW (2003) Phosphorus pools in Oxisols under shaded and unshaded coffee systems on farmers fields in Brazil. *Agroforestry Systems* 58(1):55-64.

CFSMG Comissão de fertilidade do solo do Estado de Minas Gerais (1999) Recomendação para o uso de fertilizantes e corretivos em Minas Gerais (5ª aproximação). Viçosa, MG: CFSEMG.

- Chang SC, Jackson ML (1957) Fractionation of soil phosphorus. *Soil science* 84(2):133-144.
- Debnath A, Das AC, Mukherjee D (1994) Studies on the decomposition of non-conventional organic wastes in soil. *Microbiological Research* 149(2):195-201.
- Dornbush ME (2007) Grasses, litter, and their interaction affect microbial biomass and soil enzyme activity. *Soil Biology and Biochemistry* 39(9):2241-2249.
- Duarte EM, Cardoso IM, Stijnen T, Mendonça MAF, Coelho MS, Cantarutti RB, Mendonça ES (2013). Decomposition and nutrient release in leaves of Atlantic Rainforest tree species used in agroforestry systems. *Agroforestry systems*, 87(4), 835-847.
- Embrapa (2013). Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: Rio de Janeiro.
- Fukuoka, M (1995) *Agricultura Natural: teoria e prática da filosofia verde*. São Paulo, SP. Editora Nobel 1-300.
- Gharu AD, Tarafdar JC (2016) Efficiency of Phosphatases in Mobilization of Native Phosphorus Fractions Under Different Vegetation. *Agricultural Research* 5(4):335-345.
- Goldstein AH (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture* 1(2):51-57.
- Guo F, Yost RS, Hue NV, Evensen CI, Silva JA (2000) Changes in phosphorus fractions in soils under intensive plant growth. *Soil Science Society of America Journal* 64(5):1681-1689.
- Guppy CN, Menzies NW, Moody PW, Blamey FPC (2005) Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. *Soil Research* 43(2):189-202.
- Halder AK, Mishra AK, Bhattacharyya P, Chakrabartty PK (1990) Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 36(2):81-92.
- Hedley MJ, Stewart JWB, Chauhan B (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Science Society of America Journal* 46(5):970-976.

- Illmer P, Barbato A, Schinner F (1995). Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27(3):265-270.
- Illmer P, Schinner F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 24(4):389-395.
- Illmer P, Schinner F (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 27(3):257-263.
- Kataoka R, Nagasaka K, Tanaka Y, Yamamura H, Shinohara S, Haramoto E, Sakamoto Y (2017) Hairy vetch (*Vicia villosa*), as a green manure, increases fungal biomass, fungal community composition, and phosphatase activity in soil. *Applied Soil Ecology* 117:16-20.
- Kpombekou-A K, Tabatabai M. A. (1994). Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science* 158(6):442.
- Liaud N, Giniés C, Navarro D, Fabre N, Crapart S, Herpoël-Gimbert I, Sigoillot JC (2014). Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology* 1(1):1.
- Martins GSDL (2015) Recuperação da qualidade do solo em função da revegetação natural da Ilha da Trindade.
- Massensini AM, Tótola MR, Borges AC, Costa MD (2015) Potential Phosphate Solubilization Mediated by Rhizospheric Microbiota of Eucalyptus Cultivated in a Typical Toposequence of the Zona da Mata, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 39(3):692-700
- Mendes GO, de Freitas ALM, Pereira OL, da Silva IR, Vassilev NB, Costa MD (2014) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64(1), 239-249.
- Mendonça ES, Leite LFC, Ferreira Neto PS (2001) Coffee plantation in agroforestry systems: an option to remediate degraded soils. *Revista Árvore* 25:375-383.
- Moreira FMS, Siqueira JO (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2nd edition. UFLA, Lavras, 83-161.
- Mullen MD (2005) Phosphorus in soils: biological interactions. *Encyclopedia of Soils in the Environment* 3:210-215.
- Nahas E, Assis LC (1992) Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. *Rev. Microbiol* 23(1):37-42.

- Nash DM, Haygarth PM, Turner BL, Condon LM, McDowell RW, Richardson AE, Heaven MW (2014) Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: a perspective. *Geoderma* 221:11-19.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170(1):265-270.
- Novais RF, Smith TJ (1999) Fósforo em solo e planta sob condições tropicais. Raleigh: Universidade Federal de Viçosa–North Carolina State University.
- Nunes RDS, de Sousa DMG, Goedert WJ, Vivaldi LJ (2011) Distribuição de fósforo no solo em razão do sistema de cultivo e manejo da adubação fosfatada. *Embrapa Cerrados-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Oberson A, Fardeau JC, Besson JM, Sticher H (1993) Soil phosphorus dynamics in cropping systems managed according to conventional and biological agricultural methods. *Biology and Fertility of Soils* 16(2):111-117.
- Oberson A, Frossard E (2005) Phosphorus management for organic agriculture. *Phosphorus: Agriculture and the Environment, (phosphorusagric)*, 761-779.
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology* 28: 897-906
- Rodríguez H, Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17(4):319-339.
- Santos DR, Gatiboni LC, Kaminski J (2008) Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. *Ciência Rural* 38(2).
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2(1):587.
- Silva UC, Mendes GO, Silva NMRM, Duarte JL, Silva IR, Tótola MR, Costa MD (2014) Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. *Plos One* 9(10): e110246.

- Soto RL (2016) Nematodes as Soil Quality Indicators in Coffee Systems. The Netherlands. Dissertação (Mestrado em Farming Systems Ecology) - Wageningen University.
- Tabatabai MA (1994) Soil enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2— Microbiological and Biochemical Properties, (methodsofsoilan2), 775-833.
- Taiz L, Zeiger E (2009). Fisiologia vegetal. In Fisiologia vegetal. Artmed.
- Tarafdar JC, Claassen N (1988) Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 5(4):308-312.
- Venkatesan S, Senthurpandian VK (2006) Comparison of enzyme activity with depth under tea plantations and forested sites in south India. *Geoderma* 137(1):212-216.
- Verma S, Subehia SK, Sharma SP (2005) Phosphorus fractions in an acid soil continuously fertilized with mineral and organic fertilizers. *Biology and fertility of Soils* 41(4):295-300.
- Xavier FADS, Almeida EF, Cardoso IM, Mendonça ES (2011) Soil phosphorus distribution in sequentially extracted fractions in tropical coffee-agroecosystems in the Atlantic Forest biome, Southeastern Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 89(1):31-44.
- Zhang H, Kovar JL (2009) Fractionation of soil phosphorus. *Methods of phosphorus analysis for soils, sediments, residual, and waters*. 2nd ed. Blacksburg: Virginia Tech University, 50-60.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca de alternativas, como a adoção de sistemas agroecológicos que visem principalmente à diversidade de espécies vegetais, proporcionam a conservação dos solos e conseqüentemente da biodiversidade, esses estudos são relevantes para a melhoria da sustentabilidade dos agroecossistemas mais sustentáveis. Embora muitos dos sistemas produtivos sejam baseados nos ideários da Revolução Verde, seguindo o modelo tradicional de produção, ainda assim é possível reconhecer que os estudos visando à diversidade de espécies e técnicas alternativas para a fertilidade do solo vêm ganhando espaço nos trabalhos acadêmicos. Essas realizações levaram a percepção da complexidade dos ecossistemas multifuncionais contribuindo assim para o seu melhor entendimento. Esse trabalho buscou avaliar a dinâmica do fósforo nos solos interligada a microbiota do solo em sistemas agroecológico para entender melhor a composição e mecanismos dentro desses sistemas. A maior similaridade microbiana entre SAF_{CF} e PS_{CF} é provavelmente por causa da adubação com cama de frango comum aos dois sistemas, o que homogeneiza o tipo de material orgânico adicionado ao solo. A maior diversidade verificada no SAF_{NA} pode ser devido aos resíduos de mata aportado, possivelmente portador de maior diversidade.

Os resultados encontrados aqui sugerem que os fungos solubilizadores de P demonstraram ser mais sensíveis ao tipo de adubação utilizada no manejo agroecológico, apresentando potencial de utilização como indicadores de alterações nas práticas adotadas. Também se observou que os solos cultivados com cafezais em manejo agroecológico sob SAFs favorecem a biodiversidade e riqueza de micro-organismos, potencializando a presença de microbiota solubilizadora de P. A fertilidade melhorada dos solos de sistemas agroecológicos e a maior biodiversidade encontrada em parcelas sob SAF podem tornar estes sistemas menos dependentes de insumos externos. A forma predominante de P nos solos com cafezais sob sistemas agroecológicos é a fração P-residual, uma fonte de P de longo prazo. Solos de cafezais agroecológicos de diferentes manejos apresentam potencial semelhante de solubilização de diferentes fontes de fosfatos. Fontes de P ligadas a Ca são mais facilmente solubilizada nestes ambientes.